



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal

**“Participación del transporte de auxinas en el crecimiento
direccional de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en interacción con
Achromobacter sp. 5B1”**

Que presenta:

Q.F.B. Kirán Rubí Jiménez Vázquez

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de tesis:

D. C. José López Bucio

Morelia, Michoacán, Noviembre 2020

Si quieres cambiar los frutos, primero tienes que cambiar las raíces.
Si quieres cambiar lo visible, primero tienes que cambiar lo invisible.

T. Harv. Eker

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, el D.C. José López Bucio, por su apoyo y guía durante mi estancia en la maestría. Sin duda su excelencia como investigador y su pasión por lo que hace, es una gran inspiración que me impulsa a seguir por este camino lleno de retos y a la vez de júbilos.

A mi comité sinodal conformado por los doctores Elda María Guadalupe Beltrán Peña, León Francisco Ruiz Herrera, Eduardo Valencia Cantero y Josué Altamirano Hernández por sus aportaciones y guía durante el proyecto.

A los D.C. Ramón Pelagio Flores y Javier Raya González por permitirme colaborar con ustedes y aprender de su experiencia y dedicación.

Los logros no son individuales, definitivamente la convivencia, el apoyo y la colaboración con los compañeros de laboratorio mejora los resultados en cada proyecto. Así que agradezco a mis amigos de laboratorio por cada momento que pase con ustedes y el apoyo que siempre me brindaron: Gus, Ramón, Adrián, Liz, Sara, Juanito, Bricia, Pedro, Marina, Edith, Lupita y Monse.

A mi mamá Irma por su cariño incondicional, por permitirme aprender de ella de la manera más honesta y, sobre todo, por ser una motivación cada día. A mi hermana Ámbar por ser mi apoyo y cómplice en cada decisión, las más grandes lecciones de vida, así como los aprendizajes nos han tocado juntas y a mi abuelita porque a pesar de las adversidades siempre tuvo la intención de un mejor futuro para mí.

A mis amigas Kari, Moni, Yesi, Brenda y kandy por su apoyo, por los momentos increíbles y experiencias que atesorare por siempre.

El presente trabajo fue realizado en el
Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
bajo la asesoría del D. C. José López Bucio

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	5
4.1. El sistema radicular de <i>Arabidopsis</i>	5
4.1.1. La raíz primaria.....	5
4.1.2. Las raíces laterales	7
4.2. Los reguladores del crecimiento vegetal	10
4.2.1. Las auxinas	11
4.2.1.1. Ruta de biosíntesis de auxinas.....	12
4.2.1.2. Transporte de auxinas.....	13
4.2.1.3. Inhibición del TPA	27
4.2.1.4. Señalización de las auxinas	28
4.3. Movimientos de las raíces	30
4.3.1. Gravitropismo	30
4.3.2. Fototropismo	33
4.3.3. Hidrotropismo	35
4.3.4. Tigmotropismo.....	35
4.3.5. Halotropismo	35
4.4. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento vegetal.....	36
4.4.1. Adquisición de nutrientes	37
4.4.2. Efecto bio-estimulante a través de la producción de fitohormonas	39
4.4.3. Actividad de bio-control.....	40
4.4.4. Tolerancia a estrés abiótico	41
4.4.5. Influencia de las PGPR en el desarrollo del sistema radicular	41
4.4.6. Influencia de las bacterias sobre la respuesta auxínica en la raíz.....	42
4.4.7. La “Poza salada” del desierto de Chihuahua	43
Figura 10.	45
5. JUSTIFICACIÓN	46
6. HIPÓTESIS.....	46
7. OBJETIVOS.....	46
7.1. Objetivo general.....	46

7.2. Objetivos específicos.....	46
8. RESULTADOS	47
8.1. Capítulo I	48
8.2. Capítulo II	49
8.3. Capítulo III	73
9. DISCUSIÓN	75
10. CONCLUSIÓN.....	77
11. REFERENCIAS.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Figura 2. Proceso de formación de las raíces laterales.....	8
Figura 3. Biosíntesis de auxinas en plantas.	14
Figura 4. Transporte de auxinas.....	16
Figura 5. Tráfico vesicular y la regulación de la actividad de los PIN.....	23
Figura 6. Transporte polar de auxinas, localización y actividad de los PIN en la raíz ..	26
Figura 7. Regiones de detección y respuesta a los estímulos ambientales en la punta de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
Figura 8. Respuesta gravitrópica en la punta de la raíz.	34
Figura 9. Interacción planta-bacteria	38
Figura 10. Exploración microbiológica en la zona del Desierto Chihuahuense.....	45

1. RESUMEN

Achromobacter sp. 5B1 es una bacteria aislada de la rizósfera de *Prosopis* sp. (mezquite) que crece en un ambiente salino, con la capacidad de mejorar el crecimiento y la productividad en *Arabidopsis*. El uso de plantas mutantes, transgénicas y tratamientos con el inhibidor del tráfico vesicular brefeldina A, relacionó el efecto de *Achromobacter* sp. 5B1 sobre el crecimiento de la raíz primaria y la formación de raíces laterales con el transporte y la distribución de auxinas.

Los análisis de expresión en las plantas transgénicas relacionadas con la vía de señalización y el transporte de auxinas, crecidas en contacto con *Achromobacter* sp. 5B1, mostraron la redistribución de las auxinas en la punta de la raíz, que a su vez mejoró la respuesta auxínica en los sitios de iniciación de los primordios de las raíces laterales y modificó el patrón de expresión de los transportadores de auxinas PIN reprimiendo a PIN1 y PIN7 en la provascularura, así como PIN2 en las células del córtex y la epidermis, mientras que la expresión de PIN3 se incrementó en la cofia. En comparación con las plantas silvestres, en las plantas mutantes afectadas en el transporte y la señalización de las auxinas, se agudizó el efecto en la desviación de la raíz primaria, lo que indujo la formación de giros. Nuestros resultados indican que los cambios en el transporte y la distribución de las auxinas por efecto de *Achromobacter* sp. 5B1 influyen en el crecimiento direccional de la raíz, rasgo que contribuye al desarrollo y la capacidad de adaptación al ambiente.

Palabras clave: *Achromobacter* sp. 5B1, *Arabidopsis*, raíz, transporte de auxinas.

2. ABSTRACT

Achromobacter sp. 5B1 is a bacterial strain isolated from *Prosopis* sp. (mezquite) rhizosphere that grows in a saline environment with the property of improving growth and productivity in *Arabidopsis*. The use of mutants, transgenic plants, and treatments with the vesicular traffic inhibitor brefeldin A, correlated the effect of *Achromobacter* sp. 5B1 on primary root deviation and lateral root formation with auxin transport and distribution.

Expression analysis in transgenic plants related to auxin response and transport in contact with *Achromobacter* sp. 5B1 showed the redistribution of auxin at the root tip, which in turn improved the auxin response at lateral root primordia, and modified the expression pattern of PIN proteins repressing PIN1 and PIN7 in the vasculature, as well as PIN2 in the cells of the cortex and the epidermis, whereas the expression of PIN3 was slightly enhanced. Compared to wild plants, in mutants affected in auxin transport and signaling, the bacterial effect on primary root deviation was exacerbated and coil formation was induced. Our results indicate that changes in transport and distribution of auxin by *Achromobacter* sp. 5B1 influence directional root growth, a trait that contributes to development and adaptation to the environment.

Key words: *Achromobacter* sp. 5B1, *Arabidopsis*, root, auxin transport

3. INTRODUCCIÓN

Las raíces proveen soporte estructural al follaje y exploran el suelo en busca de agua y nutrientes. La naturaleza sésil de las plantas impide que puedan escapar de las presiones ambientales, por lo que han desarrollado mecanismos para adaptarse al entorno. El crecimiento diferencial de las raíces en la zona de elongación es crucial para en el proceso de adaptación, ya que permite el movimiento discreto en respuesta a las condiciones ambientales.

El crecimiento de las raíces generalmente es bajo el suelo, lo que dificulta el estudio de los procesos de desarrollo y la observación de sus movimientos. El uso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* que posee un sistema radicular simple ha permitido explorar y comprender los mecanismos que subyacen las respuestas a estímulos como la gravedad (gravitropismo), la luz (fototropismo), el agua (hidrotropismo), la salinidad (halotropismo) y obstáculos (tigmotropismo) (Muthert *et al.*, 2020).

Las auxinas mediante los procesos de transporte, distribución y señalización participan en la modificación de los programas de desarrollo. Mutaciones en los genes que codifican para las proteínas encargadas del transporte, así como el uso de inhibidores del transporte de auxinas, afectan la concentración y distribución de las auxinas. La mutación en los genes *AUX1* y *PIN2*, que codifican para los transportadores de auxinas, resulta en raíces agravitropicas y una reducción en la formación de las raíces laterales. El inhibidor del tráfico vesicular BFA impide la localización de las proteínas en la membrana celular, alterando el flujo y la dirección de las auxinas, por lo que la actividad y la localización de los transportadores de auxinas en la membrana celular se relaciona con el crecimiento diferencial en respuesta a los factores ambientales (Armegot *et al.*, 2016).

Los factores bióticos también influyen en el crecimiento de las raíces. Algunas bacterias que resultan benéficas a las plantas y que habitan en la rizósfera, conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*), estimulan el crecimiento y la productividad a través de la adquisición de los nutrientes del suelo, la producción de fitohormonas y confieren protección contra fitopatógenos y condiciones de estrés (Vejan *et al.*, 2016;

Kumar *et al.*, 2020). La respuesta de las plantas en interacción con PGPR, frecuentemente se refleja en la reconfiguración del sistema radicular, puesto que diferentes especies de rizobacterias afectan el crecimiento de la raíz primaria y promueven la formación de raíces laterales, incrementando su capacidad de adquirir los recursos del entorno (Sukumar *et al.*, 2013; Spaepen *et al.*, 2014)

En este trabajo se realizó un estudio detallado de la interacción entre *Achromobacter* sp. 5B1 y *Arabidopsis thaliana* en diferentes condiciones de crecimiento in vitro y en suelo, se analizaron los efectos de la interacción en la producción de biomasa foliar y radicular y el cambio en la dirección del crecimiento de la raíz primaria y la formación de las raíces laterales. Mediante el uso de líneas transgénicas que expresan genes inducibles por auxinas y mutantes en esta vía de señalización, se correlacionó la respuesta de las plantas inoculadas con la bacteria con las modificaciones en el transporte y la redistribución de las auxinas.

4. ANTECEDENTES

4.1. El sistema radicular de *Arabidopsis*

La raíz es el órgano de las plantas que crece generalmente bajo el suelo y responde a las condiciones fluctuantes del ambiente. Algunas de sus funciones son: 1) proporcionar soporte estructural al tallo y follaje, 2) la adquisición de agua y nutrientes y 3) la exploración del sustrato, características que contribuyen a la supervivencia incluso bajo presiones ambientales extremas. Este órgano puede ser muy complejo, y su arquitectura está sujeta a un control genético que es dependiente de la especie vegetal, por lo que el uso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, que posee un sistema radicular simple, ha facilitado enormemente su estudio.

El sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* está formado por una raíz primaria y raíces laterales que derivan del periciclo después de la germinación (Atkinson *et al.*, 2014). Ambas estructuras pueden ser modificadas por factores ambientales como la competencia con otras plantas, los factores abióticos y la colonización por microorganismos, propiedad conocida como plasticidad fenotípica.

4.1.1. La raíz primaria

El sistema radicular se origina a partir del meristemo apical donde se localiza el centro quiescente (QC, por sus siglas en inglés *Quiescent Center*). El QC está formado por cuatro células con baja actividad mitótica, cuya función es prevenir la diferenciación de las células iniciales que lo rodean y que dan origen a los diferentes linajes celulares. Está demostrado que la eliminación o el daño de las células del QC causa el colapso del meristemo y la pérdida de la actividad proliferativa (van der Berg *et al.*, 1997). Las células iniciales en la parte superior del QC producen linajes que se extienden a lo largo del eje longitudinal de la raíz y forman las distintas capas de tejidos: la vasculatura, el periciclo, la endodermis, el córtex, la epidermis y la cofia lateral. En la parte inferior, se localizan las células iniciales de la columnela que producen las cuatro capas de dicha estructura (Fig. 1c).

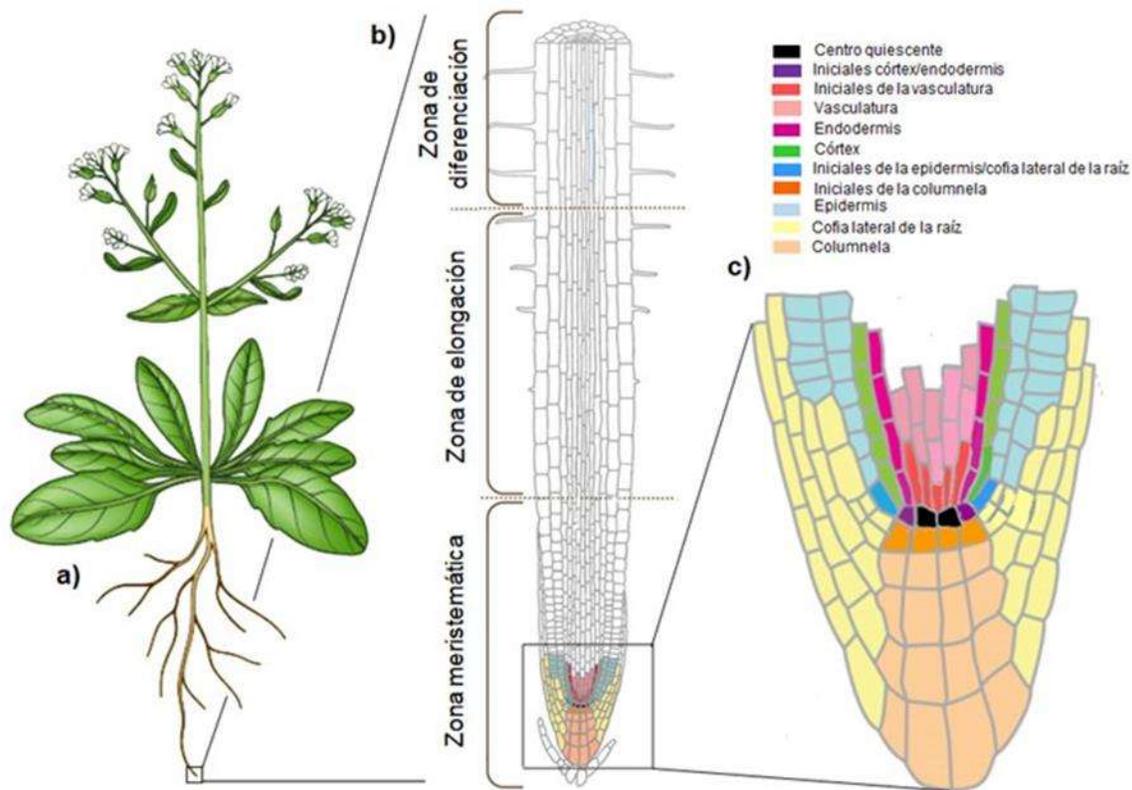


Figura 1. Estructura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. a) *Arabidopsis* pertenece al grupo de las dicotiledóneas, las cuales presentan un sistema radicular de tipo pivotante que consta de una raíz primaria y a partir de esta, se forman las raíces laterales. b) La raíz primaria consta de tres zonas principales de desarrollo: la zona meristemática, de elongación y de diferenciación. c) El centro quiescente controla la actividad de las células iniciales que dan origen a las capas de células que componen la raíz (Adaptado de Motte *et al.*, 2019).

Las células producidas por las células iniciales progresan a través de varias zonas de desarrollo: la meristemática, de elongación y la de diferenciación, respectivamente (**Fig. 1b**). En el meristemo, las células entran en un programa repetitivo de mitosis, después se expanden en la zona de elongación, antes de adquirir sus funciones y características especializadas en la zona de diferenciación (Motte *et al.*, 2019). En la parte más distal de la raíz se sitúa la cofia compuesta por las filas laterales y la columna, ambos tejidos confieren protección al meristemo frente a las condiciones edáficas y perciben las señales ambientales. Los procesos que ocurren en cada zona de la raíz son

regulados por fitohormonas, los patrones de distribución de las auxinas mantienen la organización y el funcionamiento del meristemo, además permiten la integración de los estímulos ambientales.

4.1.2. Las raíces laterales

Las raíces laterales se forman a partir de una raíz existente, usualmente raíz primaria. El proceso de su formación consta de cuatro etapas: 1) la activación de las células del periciclo, 2) la iniciación de un primordio, que comprende el desplazamiento de los núcleos en las células iniciales hasta la primera división asimétrica, 3) el desarrollo del primordio, que conduce a la formación de una estructura en forma de domo, que durante siete etapas de desarrollo crece a través de las capas celulares superpuestas y 4) la emergencia de las raíces laterales, que contribuye a la expansión radial del sistema radicular, lo que incrementa la exploración del ambiente y mejora el anclaje al suelo (**Fig. 2b**; Du y Scheres, 2018).

1). Especificación de las células fuente de la raíz lateral. En la punta de la raíz, particularmente en el meristemo basal inicia el proceso de preparación para la formación de las raíces laterales. Esto se determinó por la expresión repetida del promotor sintético de respuesta a auxinas *DR5* fusionado al gen reportero de la *luciferasa* (*DR5:LUC*) en las células del protoxilema y, posteriormente en las células del periciclo superpuestas (De Smet *et al.*, 2007). Con la finalidad de explicar la expresión repetida del marcador (actividad oscilatoria en los niveles de auxinas), se han propuesto varios modelos. Inicialmente se consideró que los cambios dependientes del gravitropismo en la distribución de auxinas eran los responsables de la elevación repetida en los niveles de auxinas, pero más tarde se mostró que esta actividad solo es modulada por la gravestimulación (Moreno-Risueno *et al.*, 2010). Xuan y col. (2016), demostraron que existe una correlación entre la muerte celular programada de la cofia lateral de la raíz y la dinámica en los niveles de auxinas. La hipótesis propuesta establece que las células de la cofia lateral durante su muerte liberan auxinas a las células vecinas, induciendo la preparación de las células del periciclo y consecuentemente, la formación de los sitios de pre-ramificación, donde se lleva a cabo la diferenciación de las células fuente (**Fig. 2a**).

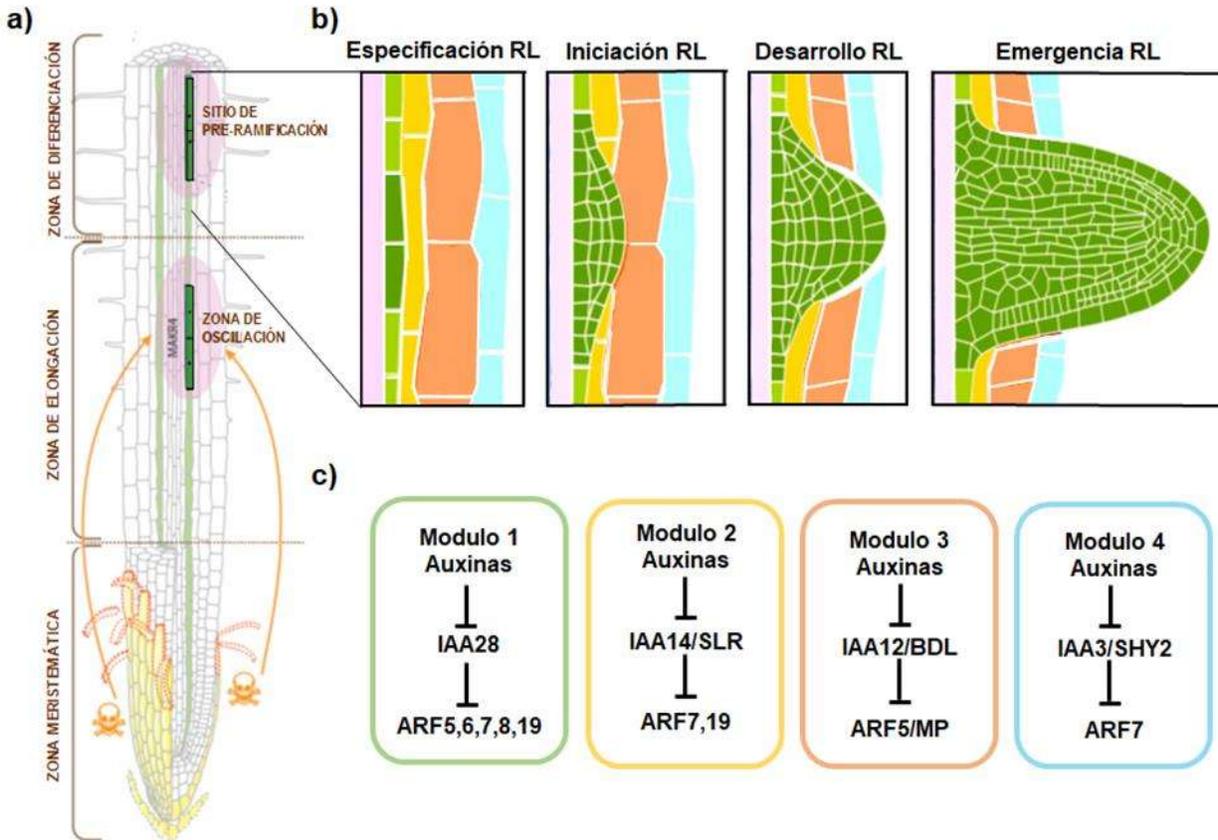


Figura 2. Proceso de formación de las raíces laterales. a) Correlación entre la muerte celular programada de las células de la cofia lateral de la raíz y la formación de los sitios de pre-ramificación. b) La primera etapa en la formación de las raíces laterales es la especificación de las células fuente, seguida de divisiones celulares asimétricas a través de las capas de tejido de la raíz, hasta su emergencia. c) Módulos de señalización de auxinas (combinaciones de Aux/IAA-ARF) involucrados en el desarrollo de las raíces laterales. (Adaptado de Motte *et al.*, 2019; Texeira y Tusscher, 2019).

La activación del periciclo es el primer proceso en la formación de las raíces laterales. Se caracteriza por una respuesta auxínica alta, que involucra el primer módulo de señalización de las auxinas: el represor IAA28 y río abajo actúan los factores de transcripción ARF5, ARF6, ARF7, ARF8 y ARF19 (De Rybel *et al.*, 2010; Texeira y Tusscher, 2019), interactuando con el factor de transcripción GATA23 (De Rybel *et al.*, 2010). Otro regulador del evento de especificación es MEMBRANE-ASSOCIATED KINASE REGULATOR 4 (MARKR4), relacionado con el sitio de pre-ramificación de la raíz lateral y su conversión en primordios, ya que las raíces de las mutantes *markr4*

presentaron menos primordios que las plantas normales (Xuan *et al.*, 2015; Du y Scheres, 2018).

2. Iniciación del primordio. En esta etapa, ocurren múltiples divisiones asimétricas (De Smet *et al.*, 2007). Estos eventos son dependientes de auxinas, caracterizado por la represión del gen *SOLITARY ROOT (SLR)* que codifica para el factor *IAA14* y se activan los factores de transcripción de respuesta a auxinas *ARF7* *ARF19*, que a su vez inducen la expresión del transportador de auxinas *PIN3*, esencial para asegurar la acumulación de auxinas dentro de las células fuente y más tarde la formación del primordio. En las células de la epidermis también se observa una expresión transitoria de *PIN3* polarizada hacia las células fuente, que contribuye en el reflujo de auxinas entre el periciclo y la endodermis, manteniendo una acumulación de auxinas que favorece la formación de una raíz lateral (Marhavy *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015).

Los factores transcripcionales *LATERAL ORGAN BOUNDARIES 16 (LBD16)*, *LBD18* y *LBD33* participan en el proceso de migración nuclear y durante las divisiones asimétricas (Berckmans *et al.*, 2011). Además, se induce la expresión de *CYCLINB1 (CYCB1)*, necesaria para la activación del ciclo celular que conduce al programa de mitosis durante la emergencia del primordio de la raíz primaria (Okushima *et al.*, 2007).

3. Desarrollo del primordio. El desarrollo del primordio transcurre en siete etapas. En esta fase, las divisiones asimétricas continúan a través de las capas superpuestas y precisamente estas capas de tejido confieren restricción mecánica al primordio, lo que propicia su característica forma de domo. En la endodermis, se encuentra la Banda de Caspari que actúa como una barrera que limita la difusión apoplástica. Para que ocurra el paso del primordio a través de las células endodérmicas se requiere la participación del módulo 4 de señalización de auxinas que induce la pérdida y el aplanamiento del volumen de las células, esto provoca la fusión de las caras de la membrana radial para formar una abertura por la cual puede penetrar el primordio y de esta manera conservar la Banda de Caspari (Vermeer *et al.*, 2014). A diferencia de la endodermis, el avance del primordio a través de las capas de córtex y epidermis, básicamente, depende del importador de auxinas *LIKE-AUXIN 3 (LAX3)* para elevar los niveles de auxinas en dichos tejidos e inducir la remodelación de la pared celular.

Durante la emergencia de los primordios, los patrones de expresión de los transportadores de auxinas se modifican. La expresión de *PIN1* se restringe a la vasculatura y *PIN3* a la región cercana al nuevo QC, mientras que *PIN2* surge después de la emergencia de la raíz lateral (Benková *et al.*, 2003). Para conducir el flujo de auxinas hacia la punta del primordio, se activa el módulo de señalización 3, que consiste en la degradación del represor (BODENLOS/INDOL-3-ACETIC ACID 12) BDL/IAA12, el cual activa al factor de transcripción MONOPTEROS/AUXIN RESPONSE FACTOR (MP/ARF5) (Fig. 2c; De Smet *et al.*, 2010).

4. La emergencia de las raíces laterales. Las raíces laterales emergen de manera perpendicular al eje de la raíz primaria, y así continúan hasta el desarrollo de la zona de elongación, región donde ocurre el cambio en el ángulo de crecimiento en respuesta a la gravedad. Sin embargo, no crecen de manera vertical como la raíz primaria, por lo que, la respuesta al estímulo gravitacional es menor.

Recientemente se encontró que los genes (*LZY*)/*DEEPER ROOTING (DRO)*/NEGATIVE GRAVITROPIC RESPONSE OF ROOTS (*NGR*) *LAZY* afectan el flujo de las auxinas, además se observó que la presencia de los miembros de la familia de genes *LAZY* varía entre la raíz primaria y las raíces laterales, razón por la que el efecto gravitropico es diferente en cada órgano. En las raíces laterales de mutantes *lzy*, tanto la respuesta auxínica como la distribución asimétrica de *PIN3* es inversa, lo cual indica que los genes *LAZY* regulan la dirección del transporte polar de las auxinas (Taniguchi *et al.*, 2017).

4.2. Los reguladores del crecimiento vegetal

Las plantas son organismos capaces de adaptar su crecimiento y arquitectura para evadir las condiciones adversas o adquirir el agua y los nutrientes necesarios para su desarrollo. Moléculas señal conocidas como reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas, son responsables de integrar las señales del ambiente. Las fitohormonas se producen en concentraciones muy bajas y son capaces de regular una gran variedad de procesos celulares, ya que actúan como mensajeros químicos (Voß *et al.*, 2014). Las auxinas, citocininas, ácido jasmónico, giberelinas, etileno y ácido abscísico son las

fitohormonas mejor conocidas, ya que durante décadas se han enfocado esfuerzos para dilucidar sus procesos de biosíntesis, transporte y señalización (Santner y Estelle, 2009).

Las actividades de las fitohormonas dependen del contexto celular, así como de las interacciones sinérgicas o antagónicas que presentan entre sí (Garay-Arroyo *et al.*, 2012). Las vías de señalización no son simples vías lineales, muestran redundancia y retroalimentación combinados entre diferentes vías. Esto dificulta entender el resultado de una señal específica, ya que, inevitablemente afecta a múltiples vías, que se regulan directa o indirectamente (Liu *et al.*, 2017). Aunque resulta complejo entender e integrar todos los componentes involucrados en un proceso vegetal, el conocimiento de la acción tejido-específico de cada fitohormona, indica cuales reguladores podrían estar implicados.

4.2.1. Las auxinas

Las auxinas fueron descubiertas en pruebas realizadas en avena en 1926, donde se demostró su participación en el crecimiento diferencial de los hipocótilos en respuesta a la luz (Enders y Strader, 2015). En la actualidad, se conoce que estas fitohormonas participan en cada aspecto del crecimiento y desarrollo de las plantas. En la etapa temprana de la embriogénesis, las auxinas determinan la división celular, el patrón de crecimiento de los tejidos y el desarrollo de los órganos. En etapas posteriores, están involucradas en las respuestas de crecimiento fisiológicas como el gravitropismo, la formación de raíces laterales y en los procesos de regeneración después de algún daño (Overvoorde *et al.*, 2010; Olatunji *et al.*, 2017).

La concentración y la distribución apropiada de auxinas (gradientes de auxinas) en los tejidos regulan los procesos de división, expansión y diferenciación celular, que determinan la forma de la planta (Casanova-Saez y Voß, 2019). Niveles elevados de auxinas causan diversas modificaciones fenotípicas, que incluyen cotiledones y hojas epinásticas, inducción de la dominancia apical del follaje, incremento en la elongación de los peciolo, inhibición de la elongación de la raíz primaria y la estimulación en la formación de las raíces laterales. Las concentraciones bajas de auxinas inhiben la elongación de los hipocótilos, alargan la raíz primaria y reducen la ramificación de la raíz (Mashiguchi *et al.*, 2011).

La forma predominante de auxina es el ácido indol-3-acético (AIA), sin embargo, el grupo de estas fitohormonas se conforma por varias auxinas, tanto naturales: ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA), ácido 2-fenilacético (APA) y ácido indol-3-butírico (AIB), como sintéticas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalen acético (ANA), ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoíco (dicamba) y ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) (Woodward y Bartel, 2005).

Respecto al desarrollo de la raíz, el establecimiento de los gradientes de auxinas que controlan la arquitectura radicular, son el resultado de la acción combinada entre la biosíntesis local, el transporte y la señalización (Brumos *et al.*, 2018). A continuación, se describirán cada uno de estos procesos, con especial énfasis en el transporte.

4.2.1.1. Ruta de biosíntesis de auxinas

La biosíntesis de auxinas ocurre principalmente en los meristemas del follaje y en las hojas jóvenes, aunque también se producen en las raíces y en los tejidos en expansión, donde son esenciales para el crecimiento de dichos órganos (Ljung *et al.*, 2005; Olatunji *et al.*, 2017). El principal precursor para la síntesis de auxinas es el aminoácido L-triptófano (Trp), producido en los cloroplastos a partir del corismato, producto final de la vía del shikimato (Maeda y Dudareva, 2012). Los derivados de triptófano que incluyen al ácido indol-3-pirúvico (AIP), indol-3-acetaldoxima (IAOx) e indol-3-acetamida (IAM), actúan como intermediarios de las diferentes rutas biosintéticas, que en conjunto se conocen como la biosíntesis de AIA dependiente de Trp (**Fig. 3**).

La ruta del AIP se lleva a cabo en dos reacciones, la primera es catalizada por las enzimas triptófano aminotransferasas (TAA1 y TARs), que convierten el Trp en AIP. En la segunda reacción, el AIP es transformado en AIA por acción de la familia de enzimas tipo flavin monooxigenasas YUCCA (YUC) (Zhao, 2012). La participación de los elementos de dicha vía fue elucidada por el uso de mutantes de *Arabidopsis thaliana*. Las mutantes sencillas *taa1*, *tar1* y *tar2* muestran fenotipos aditivos, por ejemplo, *taa1* presenta defectos en la respuesta a la gravedad, mientras que en la mutante triple *taa1 tar1 tar2*, se compromete tanto la formación de la raíz primaria como la longitud del

hipocótilo (Stepanova *et al.*, 2008). Además, en las mutantes afectadas en las enzimas YUC, el nivel de las auxinas es menor y el crecimiento de las raíces y el hipocótilo se ve afectado (Chen *et al.*, 2014). Esto demostró la función esencial de esta vía en el desarrollo de las plantas.

La vía de IAOx es exclusiva de la familia *Brassicaceae* (Sugawara *et al.*, 2009). En los cloroplastos se localizan dos enzimas citocromo P450 (CYP79B2 y CYP79B3), las cuales participan en la conversión del Trp en AIOx. Este último, es convertido en indol-3-acetonitrilo (IAN) por acción de CYP71A13 (Nafisi *et al.*, 2007). El IAN es el precursor directo del AIA, sin embargo, puede convertirse en el intermediario de otra de las rutas biosintéticas IAM, para finalmente transformarse en AIA, aunque se desconocen las enzimas involucradas. En paralelo, el IAOx es precursor de indol glicosinolatos (IGs) y camalexina, compuestos de defensa en plantas (Bender *et al.*, 2009).

La vía del IAM es fundamental en la biosíntesis de AIA en las bacterias, sin embargo, en las plantas aún no se descifra completamente la contribución de dicha vía en la biosíntesis de AIA (Casanova-Sáz y VoB, 2019). Tanto en las bacterias como en las plantas esta ruta se lleva a cabo en dos reacciones, primero ocurre la conversión del Trp en IAM, catalizado por la triptófano-2-monoxigenasa y en la segunda reacción la hidrolasa IAM (AMIDASE1, AMI1), se encarga de transformar el intermediario IAM en el AIA (Pollmann *et al.*, 2003; Sánchez-Parra *et al.*, 2014).

La producción local de auxinas en las raíces es esencial y no puede ser compensada por las auxinas transportadas a partir del sistema aéreo. Se reportó que la producción de auxinas en el follaje es incapaz de rescatar la deficiencia de la biosíntesis de auxinas en las mutantes de la raíz *yucQ*, lo que resulta en la degeneración de los meristemas de la raíz (Chen *et al.*, 2014). La fuente de auxinas producidas en la raíz es requerida para el mantenimiento del nicho de las células iniciales y el QC.

4.2.1.2. Transporte de auxinas

Las plantas poseen mecanismos de transporte para distribuir las señales y los nutrientes, que incluyen el sistema vascular y las vías de transporte intercelular. El xilema

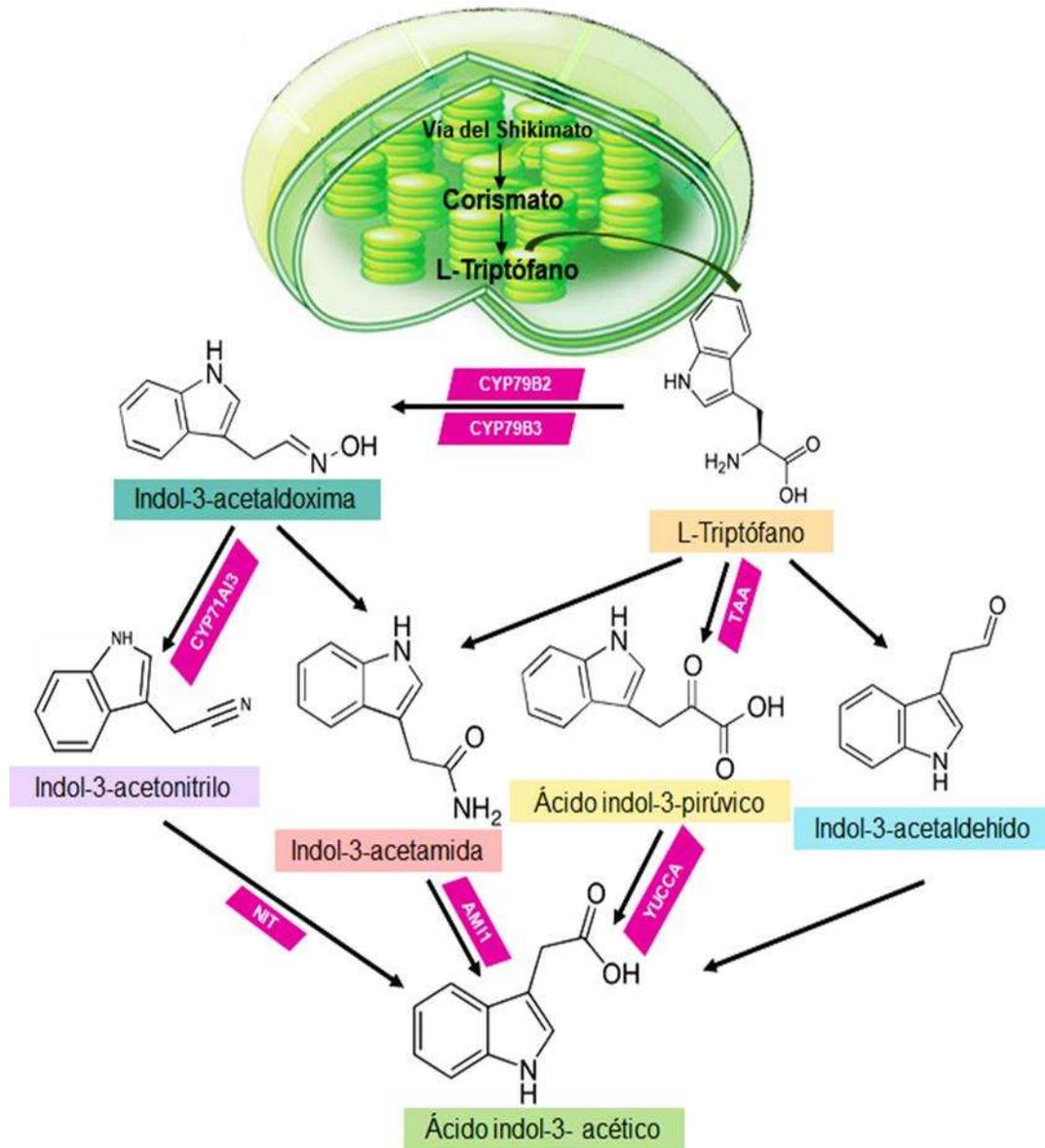


Figura 3. Biosíntesis de auxinas en plantas. Rutas de biosíntesis de auxinas dependientes de L-triptófano, aminoácido producido en los cloroplastos. (Basada de Enders y Starder, 2015; Casanova-Sáez y Voß, 2019).

transporta agua, nutrientes y fitohormonas, a partir de la raíz a la parte aérea y en el floema fluyen los productos de la fotosíntesis (fotosintatos) y algunas fitohormonas desde los sitios de biosíntesis (Robert y Friml, 2009). El transporte a distancia corta o transporte intercelular ocurre a través de tres mecanismos: 1) el transporte apoplástico, que se lleva a cabo en el espacio extracelular, 2) el transporte simplástico por plasmodesmos, que

son canales citoplasmáticos específicos de las plantas, y 3) el transporte transcelular que atraviesa tanto el espacio intra como intercelular y requiere del apoplasto.

La distribución de las auxinas en la planta combina el movimiento de larga distancia o rápido, a través del floema con el transporte célula a célula. Este último, confiere direccionalidad en el flujo de las auxinas y es conocido como transporte polar (TPA), específico de esta fitohormona y, a través de proteínas especializadas que se localizan en las membranas celulares, se generan gradientes y concentraciones máximas o mínimas, críticas para los procesos de embriogénesis, organogénesis, formación del tejido vascular, crecimiento diferencial y respuestas trópicas (Armegot *et al.*, 2016). El modelo quimiosmótico, formulado en la década comprendida entre 1970-1980, explica el mecanismo que subyace al TPA (Rubery y Sheldrake, 1973, 1974; Raven, 1975; Goldsmith, 1977). El AIA es un ácido débil, por lo que su estado de protonación es determinado por el pH de su ambiente. El apoplasto es ácido (pH=5.5), por lo tanto, el AIA se encuentra parcialmente protonado (AIAH) y puede difundir libremente a través de la membrana plasmática, aunque la entrada de auxinas en la célula a través de transportadores es necesaria. En el citosol, el pH neutro favorece la forma aniónica de la molécula (AIA⁻), incapaz de difundir a través de la membrana y queda atrapada en el interior de la célula (Friml, 2010), lo que requiere transportadores para asegurar la salida de las auxinas de la célula (**Fig. 4a**; Zazimalová *et al.*, 2010).

A partir del establecimiento del organismo modelo *Arabidopsis thaliana*, se reveló la identidad de las tres familias principales de proteínas transmembranales, que transportan las auxinas a través de la membrana plasmática, controlando el suministro espacial y temporal, para garantizar el crecimiento óptimo (Armegot *et al.*, 2016). La familia de proteínas tipo permeasas AUXIN 1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) media la entrada de las auxinas a la célula (Peret *et al.*, 2012). Las proteínas ATP-BINDING CASSETE SUBFAMILY B (ABCB) facilitan el eflujo de las auxinas e interactúan funcionalmente a diferentes niveles con los transportadores de salida de auxinas de la familia PIN-FORMED (Geisler *et al.*, 2017; Sauer y Kleine-Vehn, 2019).

Proteínas de flujo de auxinas AUX1/LAX

Las proteínas AUX1/LAX son acarreadores de entrada de las auxinas, principalmente responsables de transportarlas del apoplasto al citoplasma. Esta familia se compone por cuatro genes altamente conservados llamados *AUX1*, *LAX1*, *LAX2* y

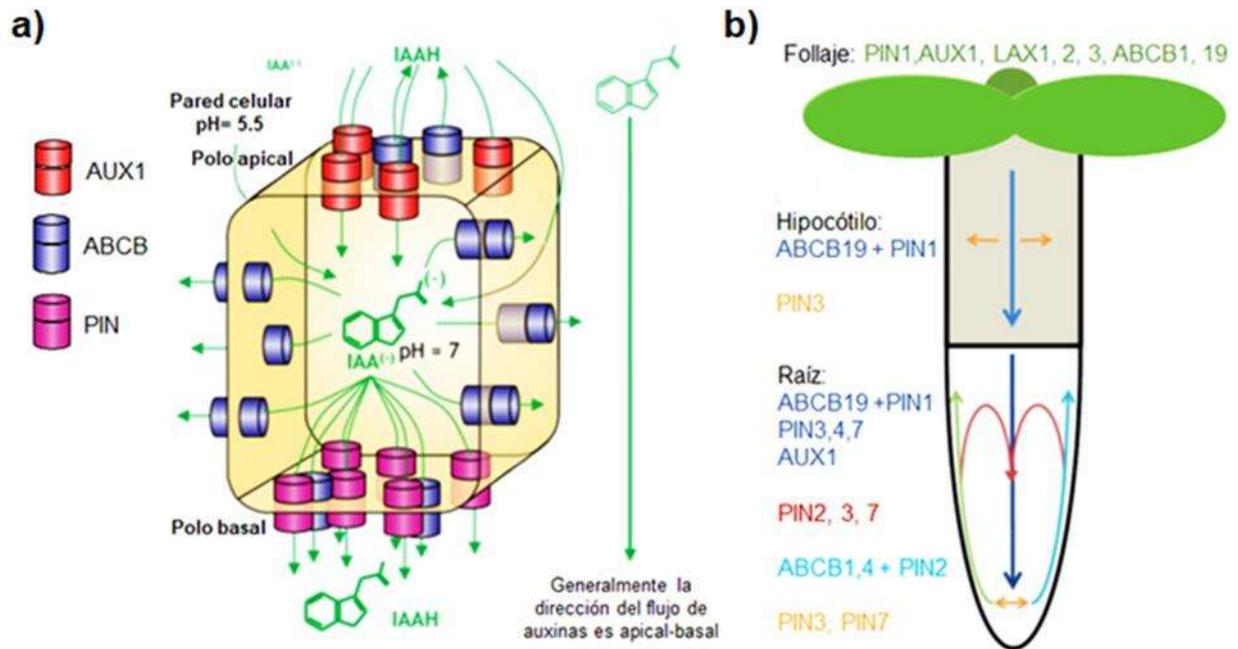


Figura 4. Transporte de auxinas. a) Modelo quimiosmótico del transporte de auxinas. El AIA es un ácido débil, en pH ácido se encuentra en mayor porcentaje en forma protonada y puede difundir a través de la membrana, no obstante el porcentaje restante ingresa a la célula a través de transportadores de influjo localizados en la membrana plasmática (AUX/IAA). El pH neutro se favorece la forma aniónica que requiere transportadores de eflujo para salir de la célula (ABCB y PIN). b) Expresión de los transportadores de auxinas en los órganos de *Arabidopsis thaliana* (Adaptado de Armegot *et al.*, 2016; Geisler *et al.*, 2017).

LAX3. Todos los miembros muestran funciones de adquisición de auxinas, especialmente *AUX1*, *LAX1* Y *LAX3* que regulan distintos procesos de desarrollo (Swarup y Péret *et al.*, 2012), mientras que, *LAX2* regula principalmente los patrones vasculares en los cotiledones (Péret *et al.*, 2012). El uso de técnicas de inmunolocalización *in situ*, así como los reporteros de respuesta a auxinas, indican que

la localización de las proteínas depende del tipo célula. En el ápice la raíz, *AUX1* se expresa en la columnela, en la cofia lateral de la raíz, en la epidermis y el tejido vascular, mientras que, *LAX3* se expresa tanto en columnela como en la estela, y *LAX1* en las regiones maduras del tejido vascular de la raíz primaria. Durante el desarrollo de la raíz lateral, *AUX1* se localiza en el primordio en todas las etapas de desarrollo, por su parte *LAX3* se localiza en el límite de la raíz lateral emergente (Péret *et al.*, 2012). Aunque las mutaciones en estos genes dan como resultado defectos en el desarrollo relacionados con las auxinas, en su mayoría no muestran una expresión redundante (Swarup y Péret, 2012; Singh *et al.*, 2018).

AUX1 fue el primer miembro de la familia en ser identificado en un escrutinio de resistencia de la raíz al suministro de la auxina sintética 2,4-D (Maher y Martindale, 1980; Bennett *et al.*, 1996). *AUX1* participa en la respuesta gravitrópica de la raíz, ya que se expresa en los tejidos que están involucrados en la percepción, la transmisión de la señal y la respuesta a la gravedad. La mutación en *aux1* provoca la formación de raíces agravitropicas, por defectos en el movimiento de las auxinas a partir del ápice de la raíz a la zona de elongación (Swarup *et al.*, 2001; Swarup y Péret, 2012). Sin embargo, los miembros restantes no participan en esta respuesta, y si bien *LAX3* se expresa en el tejido donde ocurre la percepción de la gravedad (columnela), ninguno se expresa en la zona de transmisión de la señal (CLR) o en la epidermis, donde se lleva a cabo la respuesta a la gravedad (Péret *et al.*, 2012). Estos importadores de auxinas están implicados en el desarrollo de las raíces laterales. En las mutantes *aux1*, se muestra una reducción en el número de las raíces laterales, debido a la alteración en el contenido y la distribución de las auxinas, debido a que *AUX1* facilita la carga de AIA en el sistema vascular para inducir la iniciación de las raíces laterales (Marchant *et al.*, 2002). Por otro lado, *LAX3* regula la emergencia de la raíz lateral, mediante la entrada de las auxinas a las células del córtex para inducir la expresión de *LAX3*. Esto genera una retroalimentación positiva que desencadena altos niveles de auxinas, provocando la inducción de enzimas de remodelación de la pared celular, para facilitar el paso del primordio a través de las capas celulares (Swarup *et al.*, 2008). En conclusión, las proteínas *AUX1/LAX* desempeñan una función crítica en la redirección de las auxinas en

el ápice de la raíz y la absorción en las células corticales durante la emergencia de las raíces laterales.

Transportadores de auxinas ABCB

La subfamilia de proteínas ABCB fue identificada por primera vez en líneas de cáncer de mamíferos, debido a que su expresión confiere resistencia a múltiples fármacos a los tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer. En las células no cancerosas, estas proteínas se localizan en la membrana plasmática, donde funcionan en la detoxificación (Ambudkar *et al.*, 2006).

En *Arabidopsis thaliana*, se han identificado 22 genes ABCB, incluido un pseudogen (Verrier *et al.*, 2008). Sin embargo, se considera que solo cuatro isoformas ABCB1, ABCB4, ABCB19 y ABCB21 participan en el transporte de auxinas (Geisler *et al.*, 2017). Las plantas mutantes con pérdida de función de algunos de estos miembros, muestran fenotipos usualmente relacionados con un desbalance de auxinas. Por ejemplo, ABCB1, ABCB19 y otras proteínas fueron aisladas por su unión al ácido naftil-p-talámico (NPA, por sus siglas en inglés N-1-Naphthylphthalamic acid), el cual es un inhibidor no competitivo del TPA (Noh *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2002; Geisler *et al.* 2003), pero finalmente, su identidad como transportadores de auxinas se sustentó con el hallazgo del fenotipo de enanismo y la reducción drástica del 70% en el transporte polar de auxinas, en la mutante doble de *Arabidopsis abcb1 abcb19* (Blakeslee *et al.*, 2007). De manera similar, la pérdida de función de ABCB21 resulta en la reducción del transporte de auxinas a la raíz, además, presentan defectos en el crecimiento de las raíces laterales (Jeness *et al.*, 2019). Aunque, algunas mutantes de los 17 genes restantes de la subfamilia ABCB exhiben reducciones en el TPA, no se ha esclarecido su función como transportadores de auxinas (Geisler *et al.*, 2017).

A diferencia de los transportadores tanto de importe AUX1/LAX, como de exportación de auxinas PIN, los cuales dependen de gradientes electroquímicos, el subgrupo de proteínas ABCB depende de ATP para el movimiento de las auxinas, ya que actúan como bombas activas que pueden transportar contra su gradiente (Grones y Friml, 2015; Géisler *et al.*, 2017). Adicionalmente, estas proteínas presentan un alto grado de especificidad hacia ciertos compuestos auxínicos: AIA, 1-NAA y 2,4-D (Bouchard *et al.*, 2006).

Las proteínas ABCB se localizan principalmente en los tejidos meristemáticos donde participan en la exportación del AIA al apoplasto (Bailly *et al.*, 2006). Particularmente, dos miembros de esta subfamilia (ABCB4 y ABCB21) pueden funcionar como exportadores e importadores de AIA, capacidad que es desencadenada por las concentraciones intracelulares de las auxinas (Kamimoto *et al.*, 2012). Estas proteínas, presentan una distribución no polar en la membrana plasmática, excepto durante la división celular (Geisler y Murphy, 2006). En contraste con las proteínas PIN que muestran patrones de expresión específicos, la expresión de los ABCBs es más amplia y redundante. *ABCB1* se expresa en la pro-vasculatura de la raíz, entre la CLR y la zona de elongación, así como en las células del córtex y la epidermis (Geisler *et al.*, 2005), y en conjunto con ABCB4 facilitan el transporte de auxinas hacia el follaje, ya que este último también se expresa en la epidermis de la raíz, a partir de la CLR hasta la zona de diferenciación y tiene función en el tejido vascular (Cho *et al.*, 2007). Mientras que, ABCB19 se localiza en los tejidos vasculares tanto del hipocótilo como de la raíz, intensificándose su expresión en el periciclo y la endodermis (Zazímalová *et al.*, 2010; Cho y Cho, 2012).

Cabe mencionar que las funciones de las proteínas de transporte son estrictamente reguladas por las interacciones proteína-proteína, es decir entran en contacto físico con otras proteínas para regular los procesos celulares (Gesiler *et al.*, 2017). Durante el transporte polar de auxinas, las proteínas ABCB-PIN interactúan físicamente: los extremos C-terminales de las proteínas ABCB interactúan con las asas hidrofílicas de las PIN. En cuanto a las interacciones funcionales, se observó mediante estudios de co-localización subcelular, una expresión limitada y superpuesta de ABCB1 con PIN1 en el tejido vascular y con PIN2 en las células corticales y epidérmicas (Blakeslee *et al.*, 2007). El resultado de estas interacciones favorece el transporte no polar a larga distancia por parte de las proteínas ABCBs, mientras que los PIN proporcionan direccionalidad al flujo de auxinas como veremos a continuación.

Proteínas de eflujo de auxinas PIN

Otra predicción de la teoría quimiosmótica, se fundamenta en la localización polar de un “sistema de secreción de auxinas” que podría explicar la direccionalidad en el flujo de las auxinas, en tanto que esta polaridad este coordinada a nivel de tejido y órgano

(Rubery y Sheldrake, 1974). Aunque los transportadores ya mencionados influyen en el TPA, las proteínas PIN se han estudiado con más detalle, debido a su destacada localización polar que se correlaciona con la dirección del flujo y la distribución asimétrica de las auxinas (Benkova *et al.*, 2003; Adamowski y Friml, 2015; Armegot *et al.*, 2016; Zhou y Luo, 2018; Suer y Kleine-Vehn 2019).

El primer miembro de la familia de genes *PIN* en identificarse fue *PIN1*, Okada y col. (1991) aislaron la mutante *pin-formed1 (pin1)* en *Arabidopsis thaliana*, caracterizada por la ausencia de órganos en el tallo. Específicamente su fenotipo morfológico se asemejaba al de plantas tratadas con inhibidores del TPA que mostraban una reducción del mismo. Más tarde, mediante la clonación del gen *PIN1*, se reveló que *PIN1* codifica para una proteína transmembranal con similitud a las proteínas transportadoras en bacterias y células eucariotas (Gälweiler *et al.*, 1998). En el mismo año, se aisló una mutante que presentaba raíces agravitropicas y, sorprendentemente su gen codificó para una proteína altamente homóloga a *PIN1*, nombrada como *PIN2* e identificada como componente del TPA de la respuesta gravitropica de la raíz (Muller *et al.*, 1998). Posteriormente, seis genes más fueron encontrados en el genoma de *A. thaliana*.

Las proteínas *PIN* participan en el transporte de auxinas, tanto intercelular como intracelular, la actividad en uno u otro depende de la estructura molecular y de la localización subcelular. La estructura de los miembros *PIN1-4* y *PIN7* consiste de dos regiones transmembranales separadas por una región hidrofílica, esta última alberga cuatro motivos conservados con alta similitud, por lo que se clasifican como proteínas canónicas (Bennett *et al.*, 2014; Zhou y Luo, 2018). Las proteínas *PIN* canónicas se localizan principalmente en la membrana plasmática, para cumplir su función como exportadores de auxinas de la célula, además presentan una localización polar, decisiva para dirigir el flujo de las auxinas (Adamowski y Friml, 2015). Por otro lado, las proteínas *PIN5*, *PIN6* y *PIN8* se caracterizan por una región hidrofílica más corta, flanqueada por dos regiones transmembranales. Estas proteínas se conocen como “proteínas no canónicas” y se localizan preferentemente en la membrana del retículo endoplasmático, aunque en ciertos escenarios, se presentan en la membrana plasmática, como se reportó para *PIN5* y *PIN8* (Ganguly *et al.*, 2014). Su función en la membrana del retículo endoplasmático es regular la homeostasis de las auxinas a nivel subcelular, se especula

que las auxinas que ingresan al lumen del retículo endoplasmático no están disponibles para participar en la señalización nuclear, ya que son inactivadas por enzimas de conjugación (Mravec *et al.*, 2009).

Resulta evidente la diversidad en la estructura, localización y función de las proteínas PIN. Experimentos en el musgo modelo *Physcomitrella patens*, sobre el desarrollo de las funciones de los transportadores PIN han esclarecido su origen evolutivo, así como el propósito de las modificaciones estructurales para el desarrollo de las plantas (Viaene *et al.*, 2014). Mediante estos estudios se propuso que los genes PIN evolucionaron a partir de un solo gen, debido a que los genes PIN de angiospermas comparten similitudes de secuencia entre sí, en comparación con los homólogos de las bacterias (Zhou y Luo, 2018). Sin embargo, se sugiere que las proteínas PIN obtuvieron sub y neo-funcionalización, durante la evolución de las plantas. De acuerdo con su estructura más conservada, las proteínas PIN canónicas se consideran ancestrales en comparación con los PIN no canónicas, que evolucionaron dentro del linaje canónico con neo-funcionalización. Al ser blancos de diferentes reguladores, las modificaciones ocurren especialmente en el motivo hidrofílico central, lo que contribuye a la sub-funcionalización de las PIN canónicas (Bennett *et al.*, 2014; Bennett, 2015).

La capacidad de los PIN para dirigir el transporte polar de auxinas se basa en la localización polar, la abundancia en la membrana plasmática, así como el control de la actividad de dichas proteínas por fosforilación (Adamowski y Friml, 2015; Naramoto, 2017; Zhou y Luo, 2018; Barbosa *et al.*, 2018; Sauer y Kleine-Vehn, 2019). Probablemente, el factor más importante para el establecimiento de la localización polar es el tráfico subcelular, que consiste en la entrega y el retorno de las PIN canónicas hacia y a partir de la membrana plasmática. Similar a otras proteínas localizadas en la membrana, las PIN entran en la vía secretoria durante la síntesis y pasan a través del retículo endoplasmático, y la red *trans*-Golgi, antes de alcanzar la membrana plasmática, de manera que constantemente se someten a un ciclo de reciclamiento polar y subsecuente endocitosis (Naramoto, 2017; Sauer y Kleine-Vehn, 2019). Este reciclamiento endocítico constitutivo, se determinó a partir de las observaciones con la toxina fúngica brefeldina A (BFA), que actúa como un inhibidor del tráfico vesicular desencadenando la localización no polar y la acumulación intracelular de las PIN en los

llamados compartimientos BFA, dicha agregación es completamente reversible después de remover la BFA (Geldner *et al.*, 2001). El mismo grupo vinculó el reciclamiento de PIN sensible a BFA con la función de GNOM (Geldner *et al.*, 2003). GNOM es un factor de intercambio de GDP por GTP que activa pequeñas proteínas GTPasas de la clase ARF (ARF-GEF) mediante el intercambio de GDP por GTP, para promover la formación de vesículas (Naramoto *et al.*, 2014). En las células eucariotas, BFA interrumpe el tráfico de proteínas mediado por el aparato de Golgi al evitar el intercambio de GDP y GTP en las proteínas (ARF) que se localizan en las membranas del aparato de Golgi induciendo la internalización constitutiva de PIN1 y PIN2, que se revela por su acumulación intracelular (**Fig. 5**; Adamowski y Friml, 2015; Armegot *et al.*, 2016). Además, plantas transgénicas que expresan versiones de GNOM resistentes a la BFA no presentan cambios en la localización polar de PIN1 en tratamientos con BFA (Geldner *et al.*, 2003). Los tratamientos con BFA realizados por Naramoto y col. (2014), provocaron la localización errónea de GNOM desde el aparato de Golgi a la red trans-golgi, concluyendo que GNOM actúa en el aparato de Golgi y no en los endosomas como se había propuesto en modelos anteriores.

Los transportadores PIN que se localizan en los dominios polares de la membrana plasmática, se someten al proceso de endocitosis dependiente de clatrina (Dhonukshe *et al.*, 2007). La expresión de una variante de CLATHRIN HEAVY CHAIN (CHC) interfirió con la formación de vesículas recubiertas con clatrina, lo que resultó en la afectación de la internalización de las proteínas PIN1 y PIN2 en tratamientos con BFA y, en una mutante doble *clc2 clc3* (*clatrin light chain*), se observaron deficiencias en el transporte y en la distribución de las auxinas (Wang *et al.*, 2013). Además de clatrina, otras proteínas que participan en el reciclamiento polar intervienen en el proceso de endocitosis: ARF-GEF GNOM y su homólogo GNOM LIKE 1 (Naramoto *et al.*, 2014; Adamowski y Friml, 2015). En conjunto, el reciclamiento polar y la endocitosis cumplen con el propósito de mantener la localización polar de los PIN. Este tráfico dinámico favorece los cambios rápidos en la localización polarizada de los PIN en los procesos de desarrollo y en la respuesta a las señales ambientales.

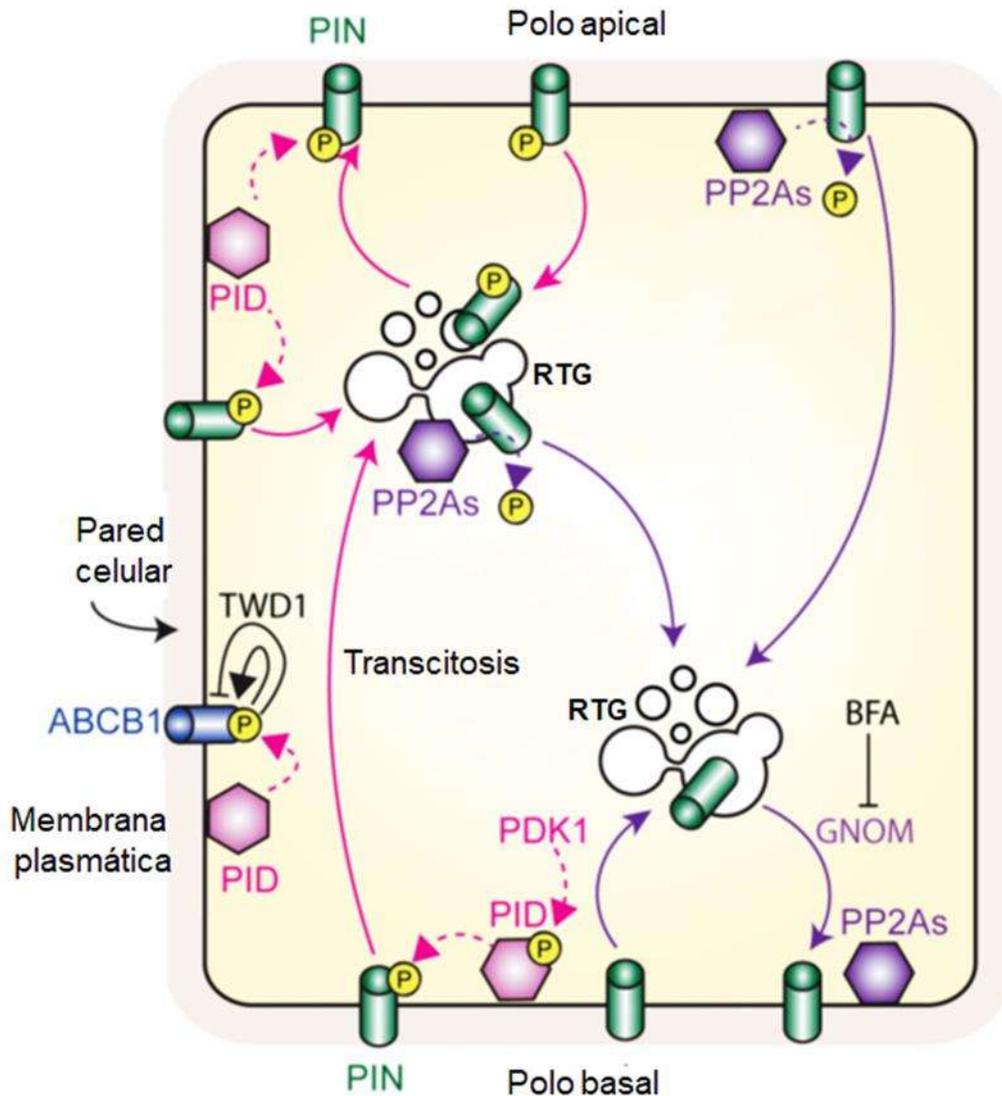


Figura 5. Tráfico vesicular y la regulación de la actividad de los PIN. Los PIN no fosforilados se someten a un reciclamiento endofítico continuo dependiente de GNOM, el cual media su localización basal. Sin embargo, BFA bloquea la actividad de GNOM, reclutando los PIN en el citoplasma. La cinasa PID fosforila los transportadores PIN en la membrana plasmática, inhibiendo el reciclamiento dependiente de GNOM. Las fosfatasa PP2As se encargan de desfosforilar los PIN y mantener la polaridad basal de PIN1, PIN2 y PIN4 (Modificada de Armegot *et al.*, 2016).

Otro factor involucrado en el TPA es el control en la cantidad de los PIN en la membrana plasmática. Dicha cantidad de los PIN está determinada por los niveles de auxinas y por las señales ambientales, sin embargo, el control de su abundancia en la membrana plasmática depende del proceso de ubiquitinación en la vacuola, el cual es

regulado por el producto génico de *MACCHI-BOU4*. MAB4 que también se localiza en la membrana plasmática e inhibe la endocitosis de los PIN, evitando su degradación en la vacuola (Naramoto, 2017). La inhibición de la endocitosis se correlaciona con la formación de aglomeraciones de PIN en la membrana plasmática, estas agrupaciones presentan una movilidad débil que restringe la difusión lateral, mecanismo que contribuye en el mantenimiento de la localización polar de los PIN (Kleine-Vehn *et al.*, 2011). La localización polarizada y la distribución de los PIN permite conocer los patrones de distribución de las auxinas y deducir la dirección de su transporte (Band *et al.*, 2014), pero el control de la actividad de los PIN requiere su fosforilación. En la familia de proteínas cinasas AGCVIII resaltan dos subfamilias de proteínas que participan en la fosforilación de los PIN: PINOID (PID) y la proteína cinasa D6 (D6PK; Naramoto, 2017; Weller *et al.*, 2017; Barbosa *et al.*, 2018).

La cinasa PINOID (PID) se relacionó con el transporte de auxinas debido a que en un escrutinio genético la mutante correspondiente *pinoid* (*pid*) presentó características similares a *pin1* (Bennett *et al.*, 1995). Sin embargo, el fenotipo de la doble mutante *pin1 pid* en comparación con las mutantes simples, descartó la idea de que PIN1 y PID actuaran en la misma vía. Los PID están distribuidos uniformemente en la membrana plasmática, donde llevan a cabo su actividad principal, fosforilar las proteínas PIN directamente en tres residuos de serina conservados S1-S3 y además participan en la localización polar (Barbosa *et al.*, 2018).

Las D6PK fosforilan las proteínas PIN en la membrana plasmática basal, y a diferencia de los PID solo participan en el control de la actividad de eflujo de los PIN localizados basalmente sin influir en su localización (Zourelidou *et al.*, 2014; Naramoto, 2017). De manera similar a los PIN, D6PK es reclutado en la membrana plasmática por GNOM y su localización es regulada por los niveles de auxinas en la célula. En este sentido, también se someten a un reciclamiento constitutivo a partir de la membrana plasmática y tratamientos con la BFA inhiben la fosforilación de los PIN. La diferencia entre los reguladores D6PK y los PIN se basa en que los primeros son internalizados rápidamente después del tratamiento con BFA y los últimos responden más lentamente (Barbosa *et al.*, 2014; Weller *et al.*, 2017).

Por otro parte, la presencia de inhibidores de fosfatasa que retrasan la desfosforilación de los PIN, llevo a la identificación de una proteína con la capacidad de regular la polaridad de PIN (PP2A, por sus siglas en inglés protein phosphatase 2A), especialmente una mutante de la subunidad regulatoria A de la proteína fosfatasa 2A (PP2AA1) incrementó la sensibilidad al inhibidor de auxinas NPA (Garbers *et al.*, 1996). La fosfatasa PP2AA antagoniza a la cinasa PID y mantiene la polaridad basal de PIN1, PIN2 y PIN4, de manera que la fosforilación por PID promueve la localización apical de PIN y la desfosforilación mediada por PP2AA lleva a la polaridad basal para regular los procesos dependientes del transporte de auxinas (**Fig. 5**; Barbosa *et al.*, 2018). De acuerdo con esta información, es importante mencionar que la inhibición de GNOM por el tratamiento con BFA en plantas *35S::PID* o mutantes *pp2a* (en los que PIN1 se localiza en el polo apical de las células del haz vascular y no en el lado basal, como es normal) no indujo la acumulación de PIN1 en los endosomas, lo que sugiere que la localización apical de los PIN es independiente de GNOM (Kleine-Vehn *et al.*, 2009).

Función de las proteínas PIN

La localización de los PIN permite la generación de vías de flujo de auxinas cruciales en la formación de los órganos y en la respuesta gravitrópica de la raíz. En la raíz primaria, el flujo de auxinas hacia la punta de la raíz (flujo acropétalo) es controlado por PIN1, PIN3 y PIN7 distribuidos en el haz vascular, PIN2 en el córtex y PIN4 en las células iniciales de la vasculatura. PIN4 también se localiza en el resto de las células iniciales y en el QC. En la columnela, PIN3 y PIN7 dirigen el flujo basipétalo hacia los tejidos de la raíz a través de las proteínas PIN2 ubicadas en la epidermis y PIN1 localizado tanto de manera basal como en el dominio interno lateral de la endodermis y en el periciclo, permite la recirculación de las auxinas (Friml *et al.*, 2002; Blilou *et al.*, 2005; Band *et al.*, 2014). Esta disposición de los PIN establece un flujo de auxinas tipo fuente invertida que genera y mantiene una acumulación de auxinas adecuada en el QC, las células iniciales, la columnela y el protoxilema (**Fig. 6**). Estudios donde la expresión ectópica de algunos genes *PIN* complementan a las mutantes *pin*, exhiben su redundancia funcional (Blilou *et al.*, 2005). La formación de nuevos órganos como las raíces laterales, requiere una elevada respuesta a auxinas en el periciclo y posteriormente, una concentración gradual hacia la zona apical, mediada por los

transportadores PIN, ya que en las mutantes *pin* se altera la frecuencia en la que se forman las raíces laterales, su desarrollo o incluso no se generan dichos órganos (Benková *et al.*, 2003; Dubrovsky *et al.*, 2008).

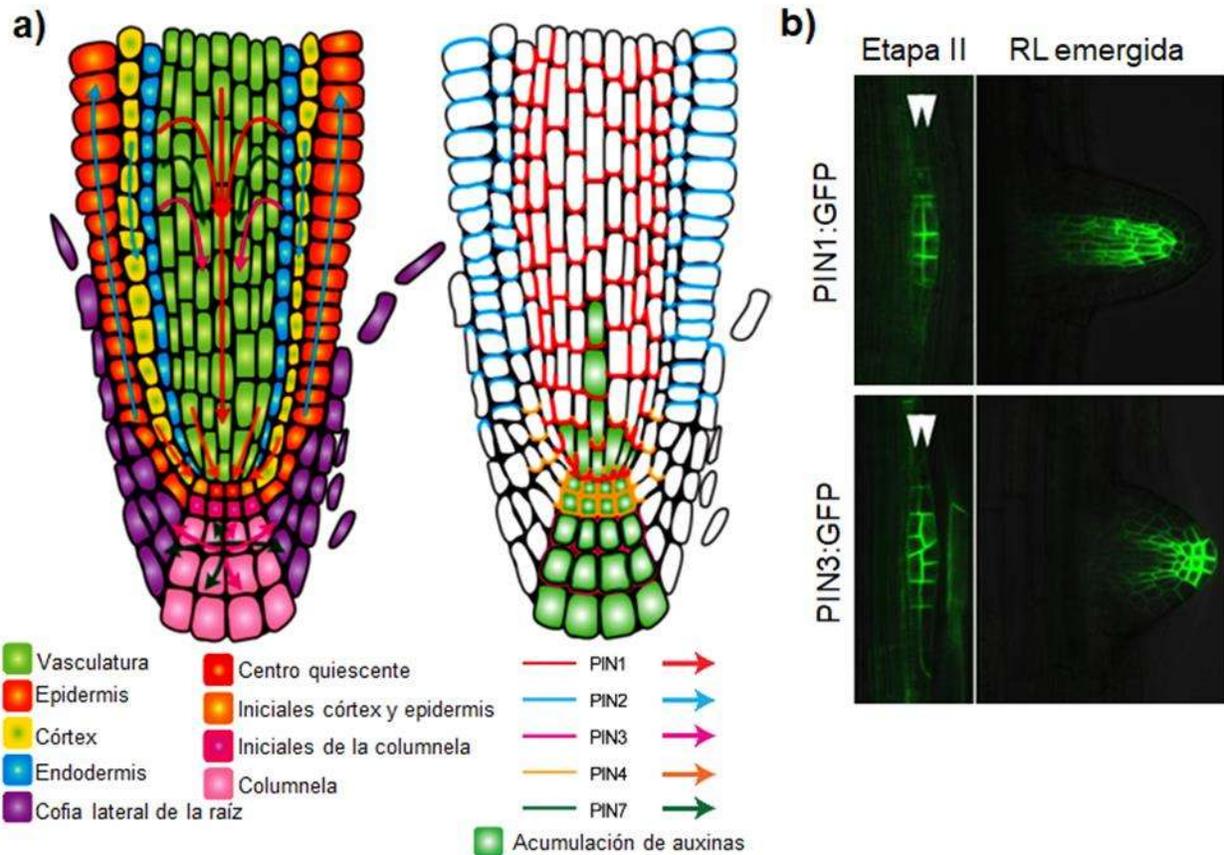


Figura 6. Transporte polar de auxinas, localización y actividad de los PIN en la raíz. a) Las flechas indican el flujo y reflujo de auxinas que mantiene la acumulación adecuada de auxinas en la punta de la raíz. El esquema de la derecha ilustra la localización apical y basal de los transportadores. b) Expresión de PIN1:GFP y PIN3:GFP en el desarrollo de las raíces laterales en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. (Adaptado de Armegot *et al.*, 2016).

En general, los PIN cambian dinámicamente su localización en respuesta a las señales ambientales y remodelan la estructura de la planta, sin embargo, cada miembro está involucrado en procesos específicos tanto en el sistema radicular como en el aéreo. PIN1 participa en el movimiento acropétalo de las auxinas en la raíz, la iniciación de órganos, la formación de hojas, las respuestas gravitrópicas y el desarrollo vascular del follaje (Okada *et al.*, 1991; Friml, 2003; Bliilou *et al.*, 2005). PIN2, participa en el transporte

basipétalo y el gravitropismo (Müller *et al.*, 1998; Blilou *et al.*, 2005; Rahman *et al.*, 2010). PIN3 interviene en la formación de la raíz lateral en las primeras etapas, la formación y el mantenimiento del gancho apical, así como las respuestas gravitrópicas y fototrópicas (Chen *et al.*, 2015; Rakusová *et al.*, 2016). De manera similar a PIN3, PIN4 también tiene un papel en la respuesta fototrópica y el desarrollo del gancho apical, además facilita la formación de los gradientes de auxinas que regulan el crecimiento de la raíz (Friml *et al.*, 2002) y PIN7 actúa como un mediador de la respuesta gravitrópica y controla negativamente el crecimiento radial de las raíces (Rosquete *et al.*, 2018).

4.2.1.3. Inhibición del TPA

En gran parte el conocimiento sobre el movimiento de las auxinas se debe al empleo de inhibidores del transporte de auxinas. Existen compuestos de distintos orígenes que pueden afectar la actividad de los transportadores de auxinas: los compuestos endógenos, los de origen no vegetal y los sintéticos (Klíma *et al.*, 2016). Una característica de los inhibidores es que actúan a diferentes niveles, desde la regulación de la expresión del gen que codifica un transportador particular, hasta su traducción, el tráfico a la membrana plasmática, su estabilidad en la membrana y la inhibición directa e indirecta de la actividad de las proteínas en la membrana.

Inhibidores endógenos

Entre los compuestos endógenos, los flavonoides modulan el transporte de auxinas uniéndose a una proteína de unión a NPA. Reportes indican que la función del transportador ABCB1 se ve afectado, así como la transcripción y localización de algunos miembros de la familia PIN (Bailly *et al.*, 2008). En una mutante deficiente en la producción de flavonoides *transparent testa4 (tt4)* se incrementa el transporte basipétalo, lo que confirma la función inhibitoria de los flavonoides en el TPA (Buer y Muday, 2004).

Inhibidores sintéticos

Por otra parte, los inhibidores farmacológicos interfieren con la actividad de los transportadores tanto de influjo como de eflujo localizados en la membrana plasmática. El ácido 1-naftoxiacético (1-NOA, por sus siglas en inglés *1-Naphthoxyacetic acid*) y otros compuestos con similitud estructural con la auxina sintética 2,4-D pueden inhibir a las

proteínas de influjo de auxinas. Las plantas tratadas con 1-NOA presentan un fenotipo agravitrópico semejante al de la mutante *aux1* (Parry *et al.*, 2001).

Las fitotropinas son otro grupo de compuestos sintéticos que inhiben el TPA, el crecimiento de la raíz y alteran el gravitropismo de manera dosis dependiente. La fitotropina canónica NPA ha sido utilizada por décadas, sin embargo, su mecanismo de acción aún no se comprende a cabalidad, aunque se han encontrado posibles proteínas de unión ubicadas en la membrana plasmática. Bailly y col. (2008), mostraron la conexión funcional del NPA a la proteína tipo inmunofilina *twisteddwarf-1* (TWD1) como un interactor de los transportadores ABCB1 y ABCB19. El NPA se une tanto a TWD1 como a ABCB1 evitando su interacción proteína-proteína, lo que provoca la disminución en el eflujo de auxinas. Además, concentraciones altas de NPA fenocopian el fenotipo de la mutante *pin1*, sugiriendo un vínculo con las proteínas PIN.

El 2,3,4 ácido triiodobenzoico (TIBA) afecta el arreglo del citoesqueleto, estabilizando los filamentos de actina, lo que induce la alteración del tráfico de los transportadores de auxinas PIN1 y AUX1 (Dhonukshe *et al.*, 2008).

Inhibidores de origen no vegetal

El compuesto representativo de este grupo es la BFA, un aislado del hongo *Penicillium brefeldianum*. Como se detalló anteriormente, los tratamientos con BFA resultan en la retención de las proteínas PIN1 y PIN2 en los compartimientos endosomales evitando su localización en la membrana plasmática. En las raíces de *A. thaliana* la BFA inhibe la orientación de los PIN hacia la membrana basal, alterando el flujo y la dirección de las auxinas (Kleine-Vehn *et al.*, 2008a). Los transportadores ABCB también presentan sensibilidad a la toxina BFA, ABCB1 se acumula en compartimientos BFA y ABCB19 es retenida en la membrana plasmática, indicando diferentes vías de tráfico para ABCB1 y ABCB19 (Kleine-Vehn *et al.*, 2006).

4.2.1.4. Señalización de las auxinas

Como se mencionó, las auxinas ingresan a la célula a través de los transportadores y regulan la transcripción de genes de respuesta a auxinas a través de una vía de señalización que involucra el complejo receptor SCFTIR1/AFB (SCF [(SKP, CULLIN, F-BOX), TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN-

RELATED F-BOX PROTEINS), los represores transcripcionales AUX/IAA (AUXIN/INDOLE-3- ACETIC ACID) y los factores de respuesta a auxinas ARF (AUXIN RESPONSE FACTORS (Salehin *et al.*, 2015; Leyser, 2018). Las mutantes individuales de la familia de genes *TIR1/AFB* presentan alteraciones fenotípicas discretas, debido a que son parcialmente redundantes y funcionan en diferentes tejidos, *tir1* es resistente a las auxinas y la raíz es ligeramente más corta que las plantas normales (Ruegger *et al.*, 1998). No obstante, la mutante triple *tir1 afb2 afb3* exhibe defectos drásticos en el crecimiento y presenta raíces agravitrópicas (Dharmasiri *et al.*, 2005b).

En concentraciones bajas de auxinas los factores Aux-IAA se unen a los ARF reprimiendo su actividad, adicionalmente reclutan a los correpresores TOPLESS (TPL), que a su vez reclutan deacetilasas que mantienen la cromatina en una configuración represiva (Chandler, 2016). Las auxinas actúan como un pegamento molecular que une el complejo receptor SCFTIR1/AFB con los represores Aux-IAA, el primero es una ubiquitina ligasa E3 que degrada a los últimos, de manera que las auxinas promueven la degradación de los represores Aux-IAA, lo que resulta en la activación de los ARF y el subsecuente inicio de la transcripción de los genes de respuesta a auxinas (Salehin *et al.*, 2015; Leyser, 2018).

Los genes de respuesta a auxinas se agrupan en tres familias: *AUX/IAA*, *Gretchen Hagen-3 (GH3)* y *Small Auxin-up Regulated RNA (SAURs)*. Las proteínas codificadas por los genes *AUX/IAA* interactúan con los ARF y por lo tanto actúan como inhibidores transcripcionales. Un ejemplo de la función de dichas proteínas en la organogénesis de la raíz, es el módulo SOLITARY ROOT (SLR)/IAA14-ARF7-ARF19, en el cual una mutación que cambia a un aminoácido en la secuencia de la proteína bloquea la degradación de SLR1, lo que causa la inhibición de la formación de las raíces laterales (Kim y Lee, 2013). La familia de genes *GH3* participa en la homeostasis hormonal mediante la conjugación de aminoácidos con las formas libres del ácido indol-3-acético (AIA), ácido jasmónico y ácido salicílico (Park *et al.*, 2007b). Los genes *SAUR* codifican proteínas involucradas en la expansión de las células, como *SAUR41* que se expresa en el centro quiescente y la célula inicial córtex/endodermis en el meristemo de la raíz (Kong *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2013).

4.3. Movimientos de las raíces

A pesar de la naturaleza sésil de las plantas, los órganos están en continuo crecimiento para percibir y responder al ambiente. Este movimiento ha sido objeto de estudio desde hace siglos, pero fue hasta la segunda mitad del siglo XIX que Charles Darwin sentó las bases para el estudio de los movimientos de los diferentes órganos en respuesta a estímulos externos como la gravedad y la luz (Darwin y Darwin, 1880). A este tipo de movimientos, se le conocen como tropismos. Los tropismos son respuestas impulsadas por el crecimiento de los órganos que se orientan en la dirección a un estímulo ambiental y son clasificados como positivos y negativos, de acuerdo con su crecimiento hacia o lejos del estímulo direccional (Meroz *et al.*, 2019; Muthert *et al.*, 2020). Entre los tropismos más estudiados se encuentran el gravitropismo, el fototropismo, el hidrotropismo, el tigmotropismo y el halotropismo.

En la raíz, las respuestas trópicas se generan por el crecimiento diferencial de los tejidos en zonas específicas, ya que las diferentes zonas que componen la raíz responden a determinadas señales ambientales (**Fig.7**; Muthert *et al.*, 2020). Para ajustar su crecimiento en respuestas a la luz y a la gravedad están involucrados cambios en los gradientes de las auxinas. No obstante, también otras fitohormonas y mecanismos están involucrados en los tropismos, como veremos a continuación.

4.3.1. Gravitropismo

Una de las mayores contribuciones en la colonización de la tierra por las plantas fue la evolución eficiente de la respuesta gravitrópica de la raíz, que les permitió crecer en profundidad en el suelo para proporcionar un mejor anclaje y aprovechar los recursos del entorno (Rakusova *et al.*, 2015). Todos los órganos de las plantas perciben el estímulo gravitacional, aunque difieren en la respuesta de crecimiento, las raíces orientan su crecimiento en dirección del vector de la gravedad (gravitropismo positivo) y en la parte aérea, el crecimiento es opuesto al vector de la gravedad (gravitropismo negativo; Vandenbrink y Kiss, 2016).

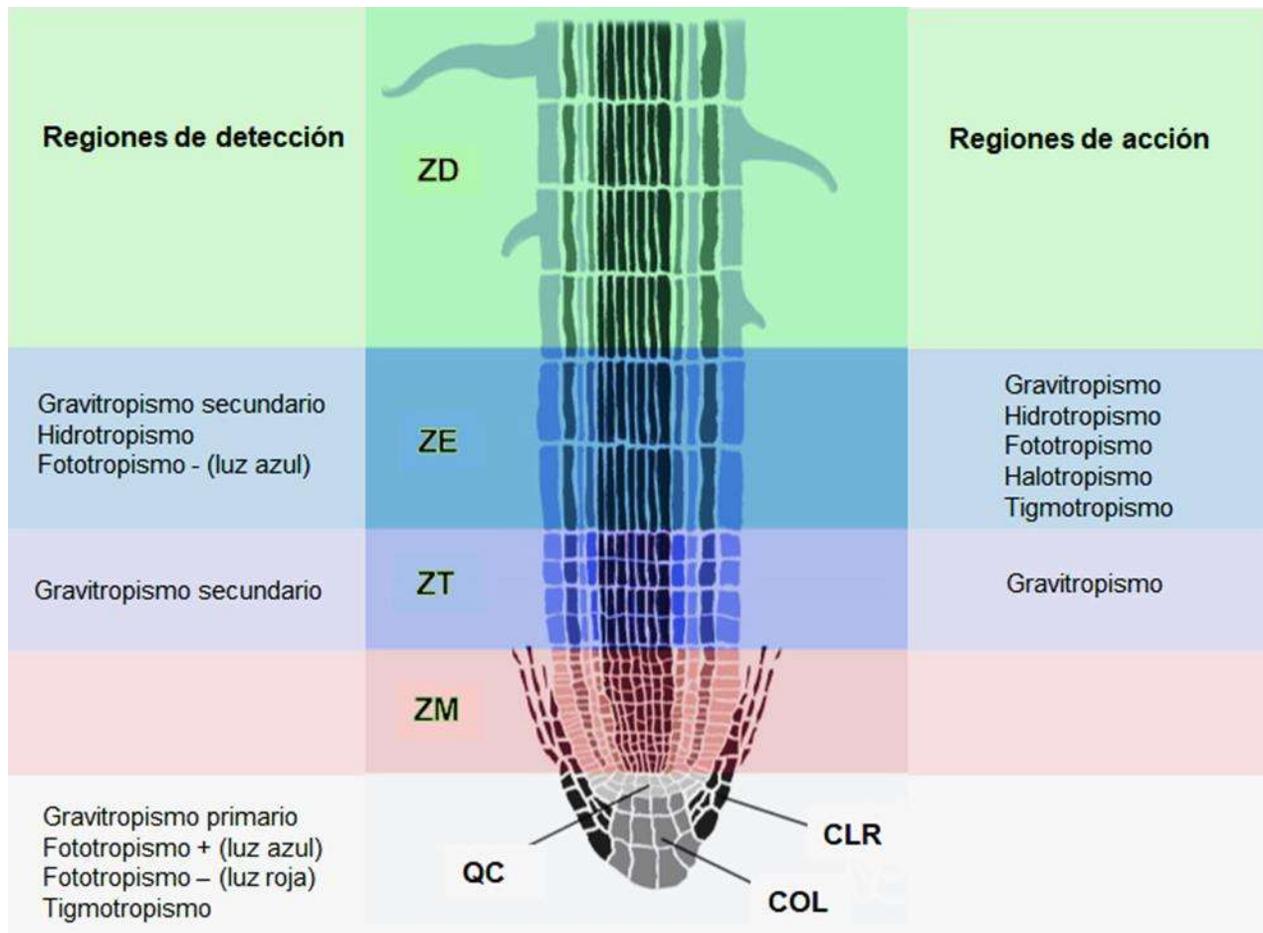


Figura 7. Regiones de detección y respuesta a los estímulos ambientales en la punta de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. En la mayoría de los tropismos, se detectan los estímulos ambientales en la cofia de la raíz y se desencadena un crecimiento diferencial en la zona de elongación, excepto en el hidrotropismo (Muthert *et al.*, 2010).

En general, el mecanismo de respuesta gravitrópica consta de tres etapas: 1) la detección de la gravedad en las células especializadas, 2) la transducción de la señal bioquímica a partir de las células de percepción hacia la zona de elongación y, 3) el crecimiento diferencial para orientar la dirección del crecimiento en función del vector de la gravedad (**Fig. 8**; Singh *et al.*, 2017).

Percepción de la gravedad

Para explicar cómo las plantas perciben la gravedad, la hipótesis de los estatolitos de almidón ha sido la más aceptada, a través de diversos enfoques experimentales en

varias especies vegetales (Kiss *et al.*, 1996; Morita, 2010). En las raíces el mecanismo primario de percepción de la gravedad ocurre en la cofia de la raíz, específicamente en las capas celulares S1 y S2 de la columela. Estas células contienen plastidios de alta densidad que contienen almidón conocidos como amiloplastos, los cuales al sedimentarse con relación al vector de la gravedad y reorientan la dirección del crecimiento de la raíz, actúan como sensores que modifican la dirección de crecimiento (**Fig. 8a**). Morita (2010), observó que en la mutante *fosfoglucomutasa (pgm)*, la cual carece de una enzima que participa en la síntesis de almidón se redujo la respuesta a la gravedad. Además, la eliminación de las células de la columela con láser y las mutantes que carecen de amiloplastos también exhiben una respuesta gravitropica reducida, lo que sugiere una función importante en esta zona (Singh *et al.*, 2017). Sin embargo, hay evidencia de otro punto de detección de la gravedad o gravitropismo secundario, ubicado en la zona de elongación, aunque la contribución de este sitio ha sido menos estudiado (Su *et al.*, 2017).

Señales que inducen la respuesta gravitropica

Cuando se reorienta la dirección de crecimiento de la raíz, los amiloplastos de las células de la columela se repositionan por sedimentación hacia el fondo de la célula, generando una señal física que posteriormente se convierte en una señal química y conduce el transporte de auxinas hacia el lado inferior de la raíz, redirigiendo su crecimiento hacia el vector de la gravedad (**Fig. 8b-d**; Nakamura *et al.*, 2019).

Algunos modelos propuestos para la percepción de la gravedad sugieren que los amiloplastos sedimentados entran en contacto con el citoesqueleto, lo que interrumpe su dirección. Además, se crea presión sobre el retículo endoplasmático y la membrana celular, estimulando la liberación de Ca^{2+} para iniciar la transducción de la señal, la cual modifica la dirección del transporte de auxinas creando un gradiente asimétrico en la raíz, desde la cofia hasta la zona de elongación (Baldwin *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2017). Se ha propuesto que las proteínas AUX1/LAX y PIN son las encargadas de mover a las auxinas en la zona de percepción de la gravedad y de crear un gradiente por su redistribución (Band *et al.*, 2014). La mutante de *Arabidopsis aux1* muestra un transporte deficiente de auxinas a partir del follaje a la punta de la raíz, provocando una reducción en la respuesta gravitropica. Monshausen y col. (2011), mediante el empleo de sensores

de pH fluorescentes, observaron que en la superficie inferior de las raíces graviestimuladas incrementó el pH, pero no en las mutantes *aux1*. Esto resalta la relevancia de AUX1 en el gravitropismo de la raíz, debido a que un incremento en el pH resulta en más auxinas en su forma aniónica AIA^- que son impermeables y, por lo tanto, requieren AUX1 para ingresar a la célula.

Por otra parte, las proteínas PIN median el cambio en el flujo de auxinas en las raíces reorientadas. PIN3 y PIN7 se relocalizan en el lado inferior de las células de la columnela, redirigiendo el flujo de auxinas hacia la parte inferior (**Fig. 8d**; Kleine-Vehn *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 2019). La expresión de las proteínas PIN depende de la concentración de auxinas, en este contexto, el incremento de auxinas induce la expresión y localización asimétrica de PIN2 contribuyendo en el flujo de auxinas hacia la zona de elongación. Su participación en la respuesta gravitrópica se demostró por el hecho de que la mutante *pin2* es agravitrópica y la redistribución de auxinas se bloquea (Adamowski y Friml, 2015; Singh *et al.*, 2017). Estos cambios en la localización polar de los PIN ocurren rápidamente a través del tráfico intracelular. Así que la relocalización de PIN3 depende de GNOM, y como se mencionó, los tratamientos con BFA inhiben la actividad de GNOM, lo que lleva a la inhibición del tráfico de PIN3 al quedar atrapado en compartimientos intracelulares (Kleine-Vehn *et al.*, 2010).

4.3.2. Fototropismo

Para percibir una mayor cantidad de luz y optimizar el proceso de fotosíntesis, los follajes manifiestan fototropismo positivo, mientras que las raíces muestran fototropismo negativo (Goyal *et al.*, 2013; Liscum *et al.*, 2014). Aunque las raíces se localicen bajo el suelo pueden exponerse y responder al estímulo de la luz (Lee *et al.*, 2016).

Las fototropinas son los fotorreceptores primarios, en *Arabidopsis* se encuentran dos de estas proteínas en las membranas plasmáticas: PHOT1 y PHOT2. PHOT1 se localiza en los tejidos internos de la zona de elongación de la raíz, donde media el fototropismo en respuesta a la luz azul (Liscum *et al.*, 2014; Harmer y Brooks, 2018). Este estímulo induce la autofosforilación de PHOT1, que a su vez desfosforila a otra proteína esencial para el fototropismo NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3 (NPH3), donde esta última, actúa como un punto de interacción entre la señal gravitrópica y

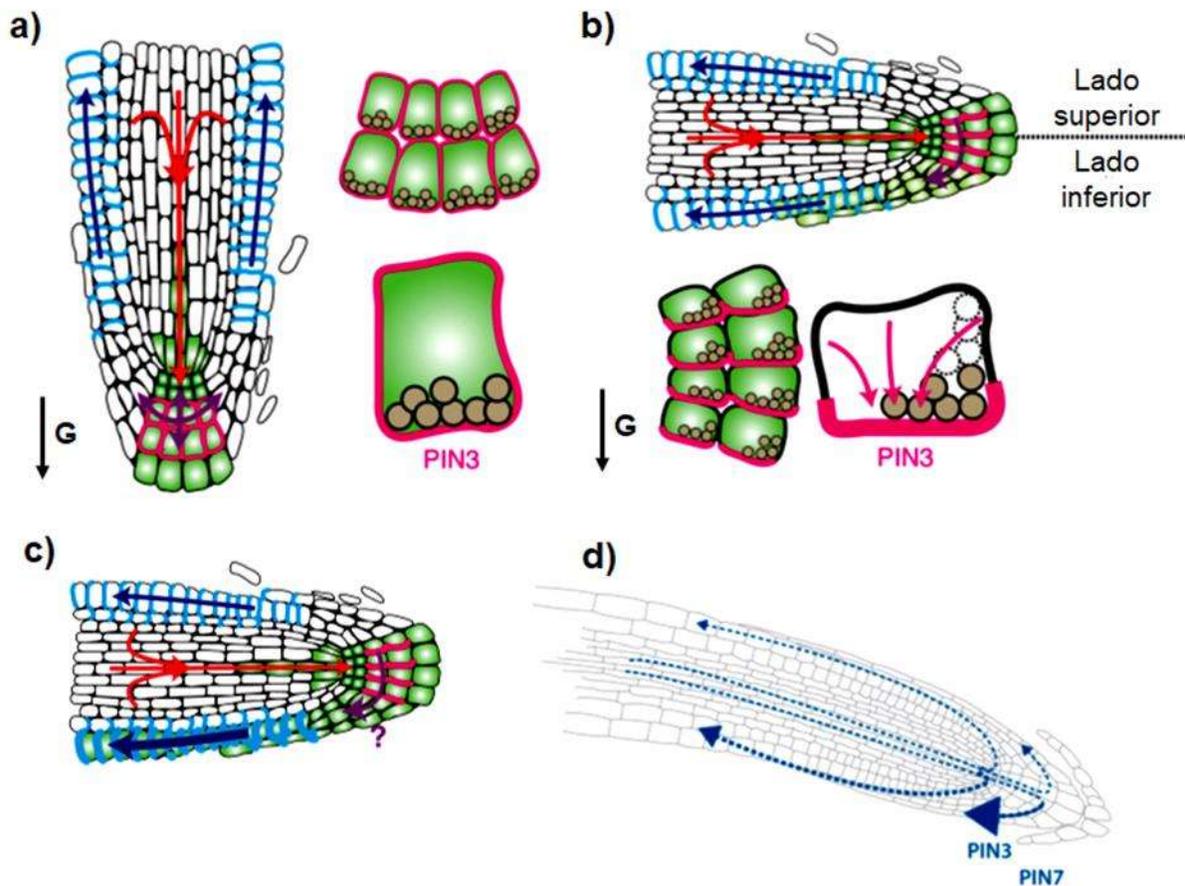


Figura 8. Respuesta gravitrópica en la punta de la raíz. a) El flujo de auxinas y la localización de PIN2 y PIN3, a la izquierda se muestra la sedimentación de los amiloplastos en las células de la columna antes de la graviestimulación. b) La reorientación de la punta de raíz provoca la sedimentación de los amiloplastos hacia el nuevo vector de gravedad, lo que modifica la localización de los transportadores PIN mediante el tráfico vesicular y se redirecciona el flujo de auxinas hacia el lado inferior de la raíz. c) El incremento en el flujo de auxinas en el lado inferior de la raíz, promueve la localización de PIN2 en la membrana plasmática, lo que induce la distribución asimétrica de auxinas. d) Crecimiento direccional de la raíz hacia el vector de gravedad (Modificado de Armegot *et al.*, 2016).

fototrópica, al influir en la redistribución de PIN2, que desencadena la reorientación de la raíz (Wan *et al.*, 2012). Al reorientarse la dirección de crecimiento de la raíz también se activa la respuesta gravitrópica (Kimura *et al.*, 2018). Es necesario enfatizar que en el follaje, especialmente en los hipocótilos ocurre la formación de un gradiente lateral de

auxinas que resulta en el crecimiento diferencial de los lados sombreados e iluminados de estos órganos.

4.3.3. Hidrotropismo

El crecimiento direccional de la raíz hacia el agua, referido como hidrotropismo, fue descrito por Von Sachs (1887). Para determinar la región de la raíz que detecta el agua, se han implementado ensayos con *Arabidopsis*. Miyazawa y col. (2009), determinaron que las células de la zona de elongación influyen en la curvatura hidrotrópica, mientras que en un estudio reciente se observó que la eliminación de las células tanto del meristemo como de la columnela no afecta el hidrotropismo, por lo que la zona de elongación realiza una función dual durante dicho estímulo (Dietrich *et al.*, 2018). Los tratamientos con bajas concentraciones de ácido abscísico (ABA) promueven tanto la división celular como la expansión (Dietrich *et al.*, 2018).

4.3.4. Tigmotropismo

El crecimiento de la raíz puede interrumpirse cuando la raíz encuentra un obstáculo como piedras, otras raíces e incluso capas o zonas del suelo más duras. En esta situación, la raíz reorienta su crecimiento para evadir, rodear o cruzar los obstáculos. La cofia es el primer sitio en percibir el obstáculo, y posteriormente se producen una serie de curvaturas: la primera ocurre en el extremo basal de la zona de elongación, seguida de una flexión en la zona de transición, en dirección opuesta a la primera. Durante la reorientación del crecimiento de la raíz para evadir el obstáculo, la cofia percibe la superficie proporcionando información táctil (Massa y Gilroy, 2003; Muthert *et al.*, 2020), proceso que implica un aumento en los niveles de Ca^{2+} y la distribución asimétrica de las auxinas en el lado cóncavo de la raíz (Monshausen *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2020).

4.3.5. Halotropismo

En las zonas de suelo con concentraciones elevadas de sal (NaCl), las raíces cambian su dirección de crecimiento. En la mayoría de las especies, las raíces crecen lejos de los gradientes de NaCl (halotropismo negativo). A pesar del estrés al que se someten en condiciones salinas, algunas especies de plantas presentan halotropismo

positivo (Shelef *et al.*, 2010). Para que se lleve a cabo una respuesta halotrópica, se tiene que atenuar el gravitropismo, posiblemente a través de la degradación de los amiloplastos de la columela (Sun *et al.*, 2008).

Varios reportes indican que el estrés salino altera el tráfico de PIN2. En la punta de la raíz, se induce la endocitosis dependiente de clatrina de PIN2, dicho incremento en la internalización disminuye la abundancia del transportador en la membrana plasmática, lo que ocurre de manera asimétrica en el lado de la raíz expuesta a un gradiente de NaCl, causando un flujo diferencial de auxinas que induce la flexión halotrópica. Además de PIN2, AUX1 muestra un patrón de expresión asimétrico y también se incrementan los niveles de PIN1 (Galvan-Ampudia *et al.*, 2013; van de Berg *et al.*, 2016). Otra vía propuesta en respuesta a gradientes de concentración de NaCl es dependiente de la proteína SALT OVERLY SENSITIVE (SOS). Las mutantes *sos1-1*, *sos2-1* y *sos3-1* mostraron un crecimiento agravitrópico comparado con las plantas de tipo silvestre. Particularmente, la mutante *sos1-1* exhibió baja degradación de los amiloplastos y no presentó disminución en los niveles de PIN2 como se observa con las plantas silvestres (Sun *et al.*, 2008).

4.4. Rizobacterias Promotoras del Crecimiento vegetal

La respuesta de las raíces a los estímulos ambientales impacta en la expresión de los genes, lo que conduce al cambio en la dirección del crecimiento, la modificación de la longitud de la raíz primaria y la frecuencia en la formación de nuevos órganos. Una de estas condiciones ambientales son las PGPR, bacterias de vida libre que colonizan las raíces y mediante diferentes estrategias contribuyen al crecimiento vegetal. La concentración de las PGPR es mayor en la zona del suelo que rodea a las raíces (rizósfera), puesto que los exudados radiculares y las células que se desprenden de la raíz, son una fuente de carbono y nutrientes que funcionan como atrayentes para las bacterias, mientras que las PGPR estimulan el crecimiento vegetal a través de la adquisición de nutrientes del suelo, la producción de fitohormonas, además le confieren a las plantas protección frente a fitopatógenos y condiciones de estrés (**Fig. 9**; Vejan *et al.*, 2016; Backer *et al.*, 2018; Etesami *et al.*, 2019).

4.4.1. Adquisición de nutrientes

Las PGPR contribuyen en la disponibilidad de los nutrientes para las plantas, a través de diferentes mecanismos que incluyen la fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo, y la producción de sideróforos.

Fijación de nitrógeno

El nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera, representa el 78% y forma parte de estructuras esenciales para la vida, como los ácidos nucleicos y las proteínas, sin embargo, los productores primarios no pueden utilizarlo. Para que las plantas puedan asimilarlo necesita ser convertido en formas asequibles, y los microorganismos como las PGPR, mediante el complejo enzimático nitrogenasa, convierten el nitrógeno gaseoso (N_2) en amonio (NH_4^+), proceso conocido como fijación biológica del nitrógeno (Backer *et al.*, 2018). Géneros como *Zoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Diazotrophicus*, *Azotobacter* y *Azospirillum* proveen nitrógeno a las plantas. Sin embargo, algunas bacterias no tienen la capacidad de fijar nitrógeno y para compensar esta propiedad, aumentan la eficiencia del uso de N incrementando el tamaño del sistema radicular o activando mecanismos moleculares para su captación (Bhattacharyya y Jha, 2012).

Solubilización de fósforo

Después del nitrógeno, el fósforo es el elemento más limitante para las plantas, debido a que participa en los procesos vitales: fotosíntesis, síntesis de macromoléculas, transducción de señales y respiración, por mencionar algunos. El mayor porcentaje se encuentra en formas orgánicas e inorgánicas insolubles. Algunos géneros de bacterias como *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*, poseen la capacidad de solubilizar los fosfatos a través de la producción de ácidos orgánicos (citrato, acetato, succinato y gluconato) y fosfatasas para que el fósforo pueda ser utilizado por las plantas (Ahemad y Kibret, 2014; Gupta *et al.*, 2015).

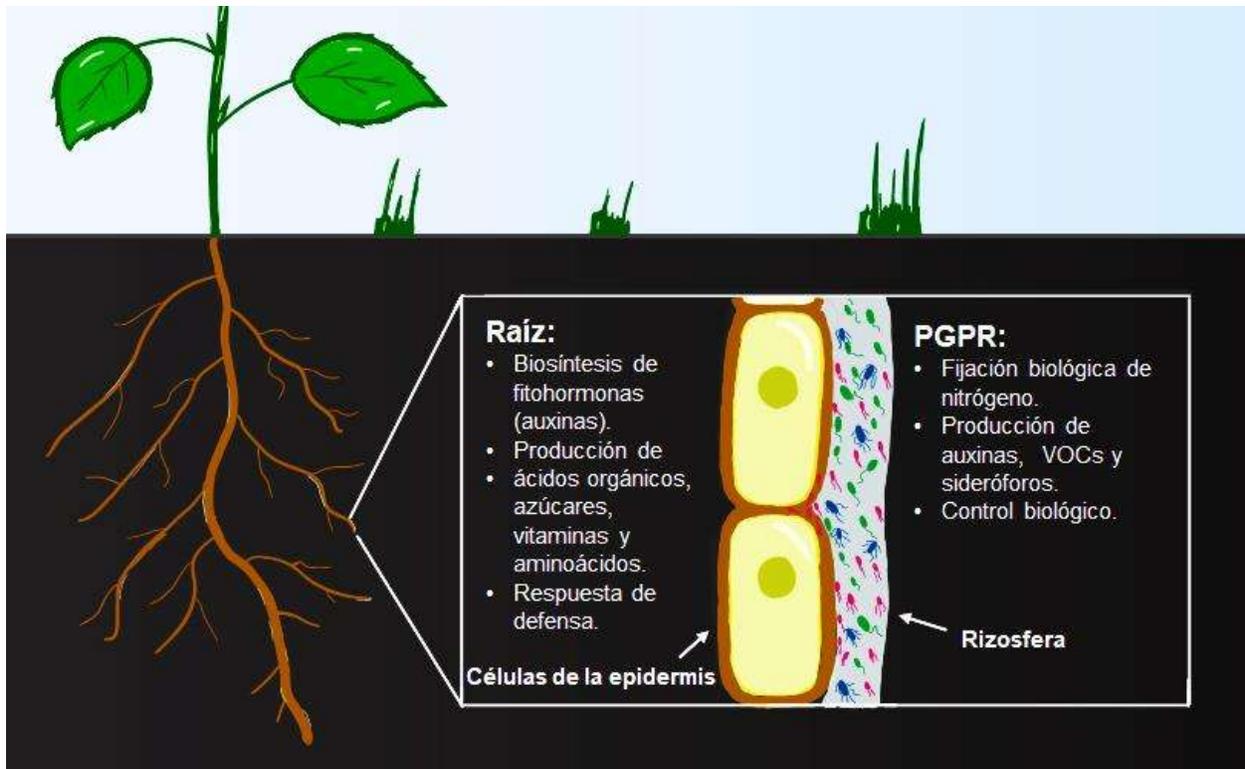


Figura 9. Interacción planta-bacteria. Las raíces liberan fuentes de carbono y moléculas de señalización, ejerciendo un efecto atrayente para las bacterias. Estas últimas, mediante diferentes estrategias promueven el crecimiento, la nutrición y la salud vegetal. La arquitectura del sistema radicular se modifica en respuesta a la interacción con rizobacterias benéficas.

Producción de sideróforos

El hierro (Fe) es el cuarto elemento más abundante en el suelo, se encuentra principalmente en forma de óxidos de Fe^{3+} . Para que las plantas puedan asimilarlo, éstas utilizan varios mecanismos, entre los que destaca la quelación. Las raíces liberan moléculas de bajo peso molecular o sideróforos quelantes del hierro, y de esta manera puede ser adquirido por las células de la raíz (Ma, 2005). Las rizobacterias también producen sideróforos e incluso con mayor eficiencia que las plantas, además antagonizan algunas especies de hongos fitopatógenos al secuestrar el hierro, limitando su disponibilidad en la rizosfera (Arora *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2015).

4.4.2. Efecto bio-estimulante a través de la producción de fitohormonas

Las PGPR influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas a través de la producción de fitohormonas como auxinas, etileno, citocininas y giberelinas. El incremento en los niveles de los fitorreguladores afecta los procesos de división y expansión celular en el sistema radicular, por lo que se modifica su crecimiento, además participan en respuesta a condiciones de estrés.

Producción de auxinas

De acuerdo con Patten y Glick (2002), alrededor del 80% de las rizobacterias sintetizan AIA. Al igual que en las plantas, el principal precursor para la biosíntesis de AIA en las PGPR es el triptófano, que se convierte en AIA a través de la ruta biosintética del ácido indol pirúvico. Las auxinas actúan como moléculas señal en el establecimiento de las interacciones planta-rizobacteria. No obstante, la función principal de esta fitohormona es promover el crecimiento vegetal, ya que están relacionadas con un mejor desarrollo del sistema radicular y un incremento en la producción de biomasa. Además, actúan en respuestas adaptativas, debido a que una actividad auxínica alta ayuda a mantener el crecimiento de la raíz bajo condiciones de estrés salino (Postma y Lynch, 2011). La producción de auxinas no se limita a especies benéficas, bacterias patogénicas también las sintetizan, por una vía sintética distinta, donde el triptófano es convertido a indol-3-acetamida y posteriormente a AIA (Bulgarelli *et al.*, 2013).

Producción de ACC desaminasa

Normalmente, el etileno participa en los procesos de senescencia y abscisión relacionados con el agobio ambiental, y es sintetizado a partir del 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Niveles elevados de esta fitohormona repercuten de manera negativa en el crecimiento de la raíz, afectando procesos como la absorción de agua y nutrientes. Algunas PGPR tiene la capacidad de controlar la acumulación de etileno, debido a que producen la enzima ACC desaminasa. El blanco de estas enzimas es el precursor ACC, degradándolo en α -cetobutirato y amonio (Glick, 2014; Vejan *et al.*, 2016). Entre los géneros de rizobacterias que destacan con actividad ACC desaminasa y, por lo tanto, confieren resistencia a las plantas en condiciones de estrés son *Azopirillum*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Kang *et al.*, 2010).

Citocininas y giberelinas

Varias especies de PGPR tienen la capacidad de producir tanto citocininas como giberelinas o solo una de estas fitohormonas, sin embargo, todavía no se comprenden los mecanismos de biosíntesis de dichas fitohormonas (Gupta *et al.*, 2015). Respecto a los beneficios en la planta, se sabe que las giberelinas influyen en el crecimiento de los brotes (Jha y Saraf, 2015), en tanto que, las citocininas estimulan la producción de exudados radiculares (Ruzzi y Aroca, 2015).

4.4.3. Actividad de bio-control

El uso excesivo de pesticidas para tratar las enfermedades de las plantas ha llevado a que los fitopatógenos desarrollen resistencia y a la alteración de los ecosistemas. Para contrarrestar este fenómeno, el incremento en el uso de microorganismos con actividad de bio-control, es decir, con la capacidad de suprimir los organismos patógenos resulta apremiante. Géneros de rizobacterias como *Pseudomonas* y *Bacillus* son considerados potenciales agentes de biocontrol, debido a que confieren protección contra hongos fitopatógenos a través de diferentes mecanismos (Gouda *et al.*, 2018).

Compuestos antimicrobianos

De acuerdo con varios reportes, la producción de antibióticos es el mecanismo más eficiente de las PGPR frente a los fitopatógenos. Los principales compuestos producidos por *Pseudomonas* son las fenazinas, tensinas, oomicina A, pirrolnitrina, cianuro de hidrogeno y los lipopéptidos cíclicos. Mientras que, otros géneros como *Bacillus* y *Streptomyces* emiten kanamicina, oligomicina A y xantobacina (Compant *et al.*, 2005; Loper y Gross, 2007). La principal característica de estos compuestos es su amplio espectro antimicrobiano, ya que tienen propiedades, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antihelmínticas, citotóxicas, fitotóxicas, antioxidantes e incluso antitumorales (Gupta *et al.*, 2015; Vejan *et al.*, 2016).

Resistencia sistémica inducida

La resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés *Induced Systemic Resistance*) es un sistema de defensa, que prepara y mejora la capacidad de respuesta

de las plantas frente al estrés biótico. La inoculación con algunas PGPR como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Serratia*, provee resistencia sistémica contra un amplio espectro de fitopatógenos como bacterias, hongos, virus y nematodos (Alvin *et al.*, 2014). Compuestos individuales microbianos son reconocidos por receptores en la superficie de las células e inducen la ISR que, a su vez, involucra la señalización tanto de jasmónico como de etileno para que las plantas reaccionen de manera más rápida y eficaz (Pieterse *et al.*, 2012).

4.4.4. Tolerancia a estrés abiótico

Las condiciones de estrés ambientales como la salinidad, la sequía y la toxicidad por metales pesados son las principales limitantes para el crecimiento y la productividad de los cultivos. La reducción del 20% de las áreas de cultivo en el mundo, se debe a la salinización de los suelos. La limitación de agua o sequia afecta los principales procesos de las plantas (fotosíntesis, absorción de nutrientes, entre otros) y la acumulación de metales pesados en el ambiente, interfiere principalmente con la absorción de los nutrientes esenciales, limitando los procesos de desarrollo (Eteseami *et al.*, 2019). Las PGPR reducen los efectos de estos estreses abióticos mediante algunos mecanismos ya mencionados, como la producción de fitohormonas y de la ACC desaminasa, el incremento en la disponibilidad de los nutrientes, y otros como la inducción de enzimas antioxidantes y la expresión de genes de resistencia a estrés, así como la producción de sustancias poliméricas extracelulares (Kumar *et al.*, 2019).

4.4.5. Influencia de las PGPR en el desarrollo del sistema radicular

Hasta ahora la mayoría de los aislados bacterianos estudiados se ha visto afectan el crecimiento de la raíz primaria, incrementan el número y la longitud de las raíces laterales, y estimulan la elongación de los pelos radiculares (Chamam *et al.*, 2013; Sukumar *et al.*, 2013). Estas modificaciones mejoran la absorción de agua y nutrientes, por lo que el uso de las PGPR contribuye en prácticas agrícolas más sostenibles.

Bacillus megaterium incrementa el número y la longitud de las raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* (López-Bucio *et al.*, 2007), los compuestos orgánicos volátiles liberados por las cepas bacterianas *Bacillus subtilis* GB03 (Zhang *et al.*, 2007) y *P.*

fluorescens WCS417 reprimen el crecimiento de la raíz primaria y estimulan el desarrollo de las raíces laterales (Zamioudis *et al.*, 2013), *Azospirillum brasilense* y *Serratia marcescens* incrementan la formación de raíces laterales en *Triticum aestivum* y *Arabidopsis thaliana* de manera dependiente de la densidad del inóculo (Spaepen *et al.*, 2007a; Shi *et al.*, 2010). *Phyllobacterium brassicacearum* no afecta la longitud de la raíz primaria ni el número de raíces laterales, sin embargo, la velocidad de ramificación incrementa notablemente (Contesto *et al.*, 2010).

4.4.6. Influencia de las bacterias sobre la respuesta auxínica en la raíz

Los cambios en la arquitectura radicular en respuesta a las interacciones con rizobacterias involucran las vías hormonales, las auxinas son clave en la regulación del desarrollo radicular, por lo que no resulta sorprendente que la respuesta auxínica se modifique. *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 indujo la expresión del marcador de auxinas *DR5:GUS*, cuya expresión se restringe a la zona donde se concentran las auxinas en la punta de la raíz (Ulmasov *et al.*, 1997; Casimiro *et al.*, 2001). La respuesta se intensificó en una región más amplia de la punta de la raíz, así como en el haz vascular (Contesto *et al.*, 2010). Experimentos con una mutante de *Azospirillum brasilense* designada como FAJ0009, la cual, está afectada en la capacidad de biosíntesis de auxinas (Costacurta *et al.*, 1994), mostraron que el fenotipo de las plantas inoculadas con FAJ0009 fue similar a las plantas control, lo que sugiere que la capacidad de *Azospirillum* para alterar el sistema radicular, principalmente se atribuye a la producción de auxinas, además, *Azospirillum* incrementa la expresión de algunos genes de respuesta a auxinas en *Arabidopsis* (Spaepen *et al.*, 2014).

Pseudomonas fluorescens WCS417 induce la división celular en el meristemo como consecuencia de un incremento en la expresión de genes de respuesta a auxinas, como se observó con el reportero sintético *DR5::vYFP* (Laskowski *et al.*, 2008) y la construcción *pAUX1::AUX1-YFP* (Swarup *et al.*, 2001). Las plantas inoculadas con WCS417 mostraron una fuerte respuesta a auxinas y la acumulación de *AUX::YFP* aumentó en la membrana plasmática de las células de la cofia lateral de la raíz y la zona meristemática (Zamioudis *et al.*, 2013). *P. fluorescens* no produce auxinas, por lo que

probablemente, podría producir compuestos con afinidad a los receptores de la familia TIR1, como en *P. aeruginosa* (Zamioudis *et al.*, 2013; Ortiz-Castro *et al.*, 2011).

Bacillus megaterium UMCV1 reduce la división celular en la raíz primaria, al disminuir la respuesta a auxinas, lo cual fue evidenciado en plantas que expresan *DR5::GUS*; sin embargo se incrementó la expresión de este marcador en los primordios de las raíces laterales, lo que sugiere que la estimulación en el crecimiento de las raíces laterales podría estar mediada por una redistribución de auxinas (López-Bucio *et al.*, 2007). Los compuestos volátiles emitidos por *Bacillus subtilis* GB03 incrementaron la acumulación de auxinas en las raíces y en el follaje (Zhang *et al.*, 2007).

Phyllobacterium brassicacearum STM196 estimula la expresión de varias enzimas de la vía de biosíntesis de auxinas en el follaje de *Arabidopsis*, adicionalmente al efecto del aumento en la longitud de las raíces laterales, participa el transporte de auxinas, ya que en una mutante afectada en el transporte de influjo de auxinas *aux1-100* de *Arabidopsis* no mostró dicho fenotipo. También en la señalización de auxinas la cepa STM196 reduce los niveles de expresión de los genes *TIR1* y *IAA7* en la raíz de *Arabidopsis* (Contesto *et al.*, 2010). Spaepen y col. (2014), mediante un microarreglo analizaron la expresión de genes de *Arabidopsis* inoculadas con una cepa silvestre (Sp245) y una mutante (FAJ0009) de *Azospirillum brasilense*, donde observaron que el número de genes expresados en la raíz aumentaba con el tiempo de muestreo, y que la cepa silvestre produjo una respuesta mayor que la cepa mutante. Además, la inoculación con *Azospirillum brasilense* Sp245 provocó una respuesta más amplia comparada con la aplicación exógena de auxinas, por lo que la expresión de genes en plantas inoculadas con Sp245 tiene un efecto adicional a la producción de auxinas bacterianas en la expresión génica de la planta, y si bien se activa la expresión de genes de otras vías hormonales, también incrementa la expresión de genes de respuesta a auxinas.

4.4.7. La “Poza salada” del desierto de Chihuahua

En el desierto de Chihuahua se localiza un sistema de pozos, marismas y manantiales rodeados de áreas extensas de sulfato de calcio (yeso). Sin duda el Valle de Cuatro Ciénegas es el más representativo y fascinante de esta región, con las características pozas de agua azul y las dunas de yeso. A pesar de las condiciones

ambientales extremas, donde impera un clima semiárido, carencia de minerales esenciales para la vida como el nitrógeno y el fósforo, y la recristalización del yeso provoca el endurecimiento del suelo e incluso forma costras duras en la superficie, una gran variedad de especies de animales, plantas y microorganismos sobreviven y proliferan en este ambiente (Romao y Escudero, 2005; Czaja *et al.*, 2014).

Dentro de esta área natural protegida también se localiza el Valle del Sobaco, específicamente al sureste del desierto en el estado de Coahuila, México (26° 10 54" N y 102° 42 24" W) (**Fig. 10**). En este valle se ubica la "Poza Salada", cuyo nombre hace alusión a su alta concentración de sal. A pesar del suelo salino y el pH=8.61 varias especies vegetales como pastizales y matorrales o arbustos crecen en los alrededores de la poza. Resulta sorprendente que en este ambiente hostil se desarrollen las plantas. Sin embargo, el microbioma de la rizosfera de estas plantas puede tener gran influencia en el crecimiento y la resistencia a condiciones ambientales extremas. Como parte de un escrutinio en la rizosfera del pastizal (*Distichlis spicata*) se observó que los microorganismos benéficos obtenidos tienen la habilidad de resistir a altas concentraciones de sal y proveen beneficios a la planta, particularmente los aislados bacterianos *Bacillus* sp. y *Pseudomonas lini* promueven y confieren protección contra la salinidad (Palacio-Rodriguez *et al.*, 2017). Los arbustos de mezquite (*Prosopis* sp.) son otra importante especie vegetal que crece cerca de la "Poza Salada" y además actúan como estabilizadores de las dunas de yeso, por lo que resultó de particular interés para nuestro grupo de trabajo estudiar su microbioma rizosférico.

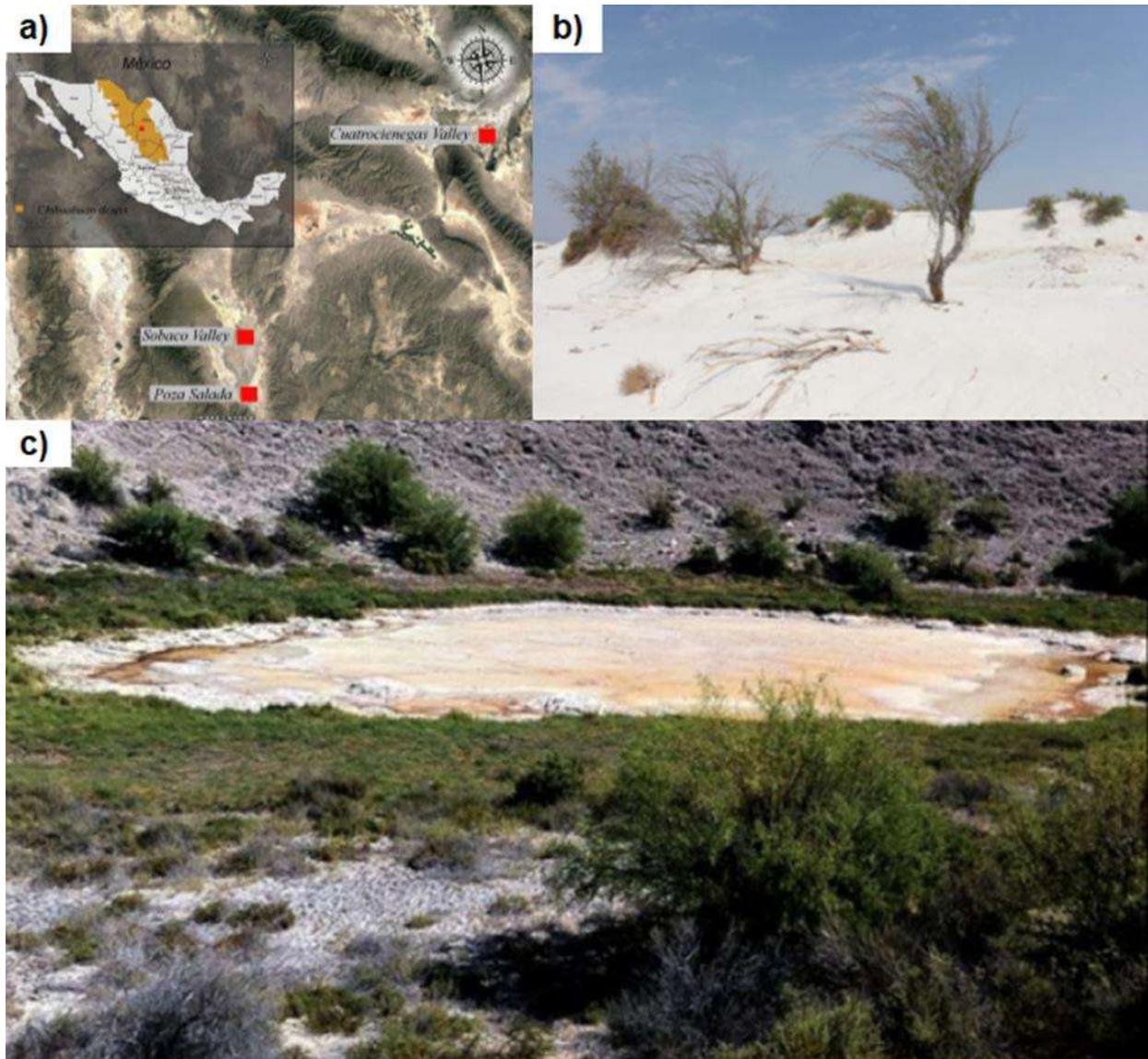


Figura 10. Exploración microbiológica en la zona del Desierto Chihuahuense. a) Localización geográfica del sitio de muestreo en la “Poza Salada” en el Valle de Sobaco en Coahuila, México. b) Dunas de yeso en los valles de desierto de Chihuahua c) Fotografías de la “Poza Salada” y los arbustos de Mezquites creciendo alrededor de la Poza.

5. JUSTIFICACIÓN

El aislado bacteriano 5B1 proveniente de la “Poza salada” es una bacteria que influye en el crecimiento de la raíz, rasgo que podría ser importante para una coadaptación al ambiente. La distribución diferencial de auxinas afecta los tropismos y los procesos de organogénesis vegetal, por lo que evaluar la participación del transporte de auxinas en la interacción entre 5B1 y *Arabidopsis thaliana* nos ayudaría a entender la contribución del microbioma sobre el comportamiento de la raíz en ambientes extremos.

6. HIPÓTESIS

El aislado bacteriano 5B1 influye en la dirección del crecimiento y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* a través de cambios en la distribución de auxinas.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Determinar la participación del transporte de auxinas en el crecimiento direccional de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en interacción con la cepa 5B1.

7.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar la posición taxonómica de la cepa 5B1.
2. Evaluar la redistribución de auxinas en la raíz de *Arabidopsis thaliana* en interacción con la cepa 5B1.
3. Determinar los cambios en la respuesta auxinas en plántulas de *Arabidopsis* inoculadas con la cepa 5B1.
4. Analizar la participación de los transportadores de auxinas en la raíz en interacción con la cepa 5B1.

8. RESULTADOS

8.1. Capítulo I.

Portada de la revista. Volumen 103, número 5, agosto 2020.
<http://www.theplantjournal.com> | issn 1365-313X.

8.2. Capítulo II.

Jiménez-Vázquez, K.R., García-Cárdenas, E., Barrera-Ortiz, S., Ortiz-Castro, R., Ruiz-Herrera, L.F., Ramos-Acosta, B.P., Coria-Arellano, J.L., Sáenz-Mata, J. and López-Bucio, J. (2020) The plant beneficial rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1 influences root development through auxin signaling and redistribution. *The Plant Journal*. 103, 1639–1654.

8.3. Capítulo III.

Leonie Verhage. (2020) Underground allies: how bacteria stimulate plant growth by altering root development. *The Plant Journal*. 103, 1637–1638.

8.1. Capítulo I

the plant journal



VOLUME 103 | NUMBER 5 | AUGUST 2020
<http://www.theplantjournal.com> | ISSN 1365-3113

WILEY
Blackwell

8.2. Capitulo II

The plant beneficial rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1 influences root development through auxin signaling and redistribution

Kirán R. Jiménez-Vázquez¹ , Elizabeth García-Cárdenas¹ , Salvador Barrera-Ortiz¹ , Randy Ortiz-Castro² , León F. Ruiz-Herrera¹ , Blanca P. Ramos-Acosta³ , Jessica L. Coria-Arellano³ , Jorge Sáenz-Mata³  and José López-Bucio^{1*} 

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, C. P. 58030, México,

²Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C., Carretera Antigua a Coatepec 351 El Haya, Xalapa, Veracruz 91070, México, and

³Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad S/N, Frac. Filadelfia, Gómez Palacio, Durango C.P. 35010, México

Received 26 February 2019; revised 10 May 2020; accepted 15 May 2020.

*For correspondence (e-mail jlbucio@umich.mx).

SUMMARY

Roots provide physical and nutritional support to plant organs that are above ground and play critical roles for adaptation via intricate movements and growth patterns. Through screening the effects of bacterial isolates from roots of halophyte Mesquite (*Prosopis* sp.) on *Arabidopsis thaliana*, we identified *Achromobacter* sp. 5B1 as a probiotic bacterium that influences plant functional traits. Detailed genetic and architectural analyses in *Arabidopsis* grown *in vitro* and in soil, cell division measurements, auxin transport and response gene expression and brefeldin A treatments demonstrated that root colonization with *Achromobacter* sp. 5B1 changes the growth and branching patterns of roots, which were related to auxin perception and redistribution. Expression analysis of auxin transport and signaling revealed a redistribution of auxin within the primary root tip of wild-type seedlings by *Achromobacter* sp. 5B1 that is disrupted by brefeldin A and correlates with repression of auxin transporters PIN1 and PIN7 in root provasculature, and PIN2 in the epidermis and cortex of the root tip, whereas expression of PIN3 was enhanced in the columella. In seedlings harboring *AUX1*, *EIR1*, *AXR1*, *ARF7ARF19*, *TIR1AFB2AFB3* single, double or triple loss-of-function mutations, or in a dominant (gain-of-function) mutant of *SLR1*, the bacterium caused primary roots to form supercoils that are devoid of lateral roots. The changes in growth and root architecture elicited by the bacterium helped *Arabidopsis* seedlings to resist salt stress better. Thus, *Achromobacter* sp. 5B1 fine tunes both root movements and the auxin response, which may be important for plant growth and environmental adaptation.

Keywords: *Arabidopsis*, auxin signaling, development, root biology, meristems.

INTRODUCTION

Roots support plants via soil attachment, exploration and environmental sensing. Their spatial configuration, defined as root architecture, is an important agronomic trait of increasing relevance due to its direct role in water and nutrient acquisition. The study of the mechanisms that determine root architecture has been difficult because roots grow deeply into the ground. To solve this limitation, several experimental systems have been established, which allow the earlier stages of growth to be analyzed *in vitro*. Advances in this field were boosted by the use of *Arabidopsis thaliana*, which develops a tap root system, in

which the primary root grows indeterminately due to the activity of the root apical meristem and for which genetic stocks and growth procedures are well established (Smith and De Smet, 2012; Atkinson *et al.*, 2014).

Roots are very sensitive and move towards water (hydrotropism) and gravity (gravitropism), and react to touch and hard substrates (thigmotropism) such that these dynamic responses are important for plant foraging of resources (Ruiz-Herrera *et al.*, 2015; Su *et al.*, 2017; Dietrich, 2018). Root movements are typically slow and difficult to observe as they occur below ground. However, root navigation circumvents physical obstacles and is integral to

plant function and adaptation (Falík *et al.*, 2005; Oliva and Dunand, 2007; Hammer and Brooks, 2018). The underlying molecular and physiological mechanisms remain unknown.

Phytohormones are implicated in root movements with auxin playing a critical role in gravitropism and abscisic acid in hydrotropism (Su *et al.*, 2017; Dietrich, 2018). In *Arabidopsis* mutants that are defective in the auxin intake permease *AUX1* or the efflux transporter gene *EIR1/AGR1/PIN2*, the gravity response is lost and this leads to the formation of circles called coils (Chen *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Marchant *et al.*, 1999; Swarup *et al.*, 2005). Coil formation also involves *AXR4*, a modulator of *AUX1* (Dharmasiri *et al.*, 2006), and *WAG1* and *WAG2*, which code for protein kinases that influence PIN protein activity (Santner and Watson, 2006). Gravitropism triggers auxin redistribution from the center of the primary root to external cell layers within minutes to promote directional growth towards the gravity vector, thus auxin transport is tightly linked to root tip navigation (Abas *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2010; Geisler *et al.*, 2014).

The formation of coils on primary roots of *patatin-related phospholipase-A1-1* (*pp1at-1*) *Arabidopsis* mutants was exacerbated following application of the auxin efflux transport inhibitor 1-naphthylphthalamic acid or the influx transport inhibitor 1-naphthoxyacetic acid, as well as in response to far red light in a process mediated by *PHYB* (Effendi *et al.*, 2014; Perrineau *et al.*, 2016). Moreover, the influence of light and sugars on coiling has already been studied by Singh *et al.* (2014), who showed that glucose affects root navigation. Thus, light provision via photosynthesis and/or sugar availability modulates auxin redistribution within the root tip to instruct the direction of growth, which may help soil exploration and/or penetration.

The root-associated microbial communities play fundamental roles in plant nutrition, development and defense (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015; Lemanceau *et al.*, 2017). The term plant growth promoting rhizobacteria was coined to typify the bacterial strains isolated from roots in their natural environment, which improve growth, development and productivity (Lugtenberg and Kamilova, 2009; Verbon and Liberman, 2016). The mechanisms by which these beneficial bacteria influence host physiology include the production of phytohormones and quorum-sensing signals, which diffuse between cells, volatile blends perceived at long distances and/or macromolecular constituents that are recognized upon bacterial-root contact (López-Bucio *et al.*, 2007; Ortiz-Castro *et al.*, 2008; Ortiz-Castro *et al.*, 2011; Pérez-Flores *et al.*, 2017; Stringlis *et al.*, 2018). Despite the knowledge gained in recent years on plant growth promoting rhizobacteria research, the influence of bacteria on root behavior or tropic responses remains largely unexplored.

Root tropisms are controlled by environmental perception and tactile exploration that rely on endogenous

genetic factors, stimuli integration and cellular responses for rapid cell division and elongation readjustments. Here, we discovered and characterized an *Achromobacter* sp. 5B1 strain that show several probiotic attributes both *in vitro* and in soil and noteworthy, deviates root growth from the gravitropic vector promoting lateral root development. Through a combination of cellular, molecular and genetic analysis, we show that the bacterial-induced root tip navigation and architectural reconfiguration is a dynamic process involving auxin-dependent and -independent mechanisms. These results point to a critical role of rhizobacteria not only on plant performance, but also on root behavior.

RESULTS

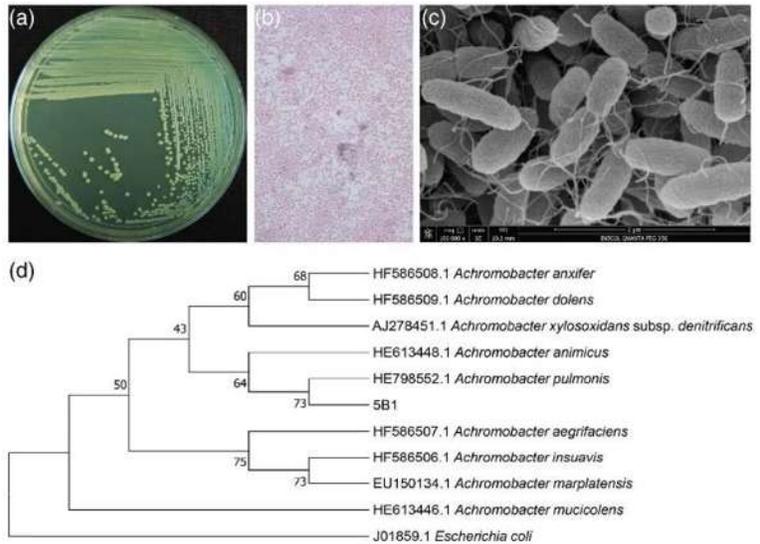
Isolation and characterization of *Achromobacter* sp. 5B1

Plants harbor very diverse and rich microbiomes that support adaptation to adverse conditions (Bulgarelli *et al.*, 2012). An exploration to the “Poza Salada,” a salty pool located in the Sobaco Valley, southeast of the Chihuahuan Desert in the state of Coahuila, México, showed several healthy Mesquite trees growing at the sides of the pool, despite the high salt content of the soil. Root samples were collected from a single tree and 43 bacterial isolates were recovered, which were co-cultivated in direct contact with *Arabidopsis* roots *in vitro* to assess their growth promotion potential. A single isolate termed 5B1 was obtained from the rhizosphere, cultivated on free nitrogen medium with 3% NaCl and successfully propagated on Luria-Bertani (LB) medium (Figure 1a) and both gram-staining and electronic microscopy analyses, respectively, grouped it as a gram-negative (Figure 1b), flagellated bacterium (Figure 1c). 16S rRNA gene sequencing and sequence comparisons using the BLAST algorithm positioned it as part of the *Achromobacter* genus, closely to *A. pulmonis* (Figure 1d).

Achromobacter sp. 5B1 is a plant growth promoting rhizobacterium

Arabidopsis thaliana is a useful plant model to assess the molecular and physiological responses to rhizobacteria. Co-cultivation experiments using agar plates were initially performed to unravel the plant responses to root colonization with *Achromobacter* sp. 5B1 *in vivo*. The effects of bacterization on root architecture and biomass production were analyzed in *Arabidopsis* wild-type (WT) (Col-0) seedlings whose roots were placed over axenic, agar-solidified medium, or over a bacterial streak and grown for six additional days. *Achromobacter* sp. 5B1 promoted primary root growth, and increased the lateral root number and density approximately fourfold, which correlated with a twofold increase in total fresh weight and shoot fresh weight and with a threefold increased root fresh weight (Figure 2a–f). The bacterial effects could be confirmed in experiments,

Figure 1. Characterization of *Achromobacter* sp. 5B1. (a) Representative image of bacterial colonies grown on a Luria-Bertani solidified medium. Isolated colonies were streaked on MS 0.2× media to interact with *Arabidopsis* seedlings. (b) Gram staining of bacterial cells in a bright-field micrograph showing gram-negative rods. (c) Scanning electron microscopy of bacterial cells with flagella. (d) Phylogenetic tree of the 16S rRNA sequence of the 5B1 strain and nine additional sequences with 99% similarity. 16S rRNA sequence of J01859.1 *Escherichia coli* was used as the outgroup.



including many more samples and up to 11 Petri plates with six seedlings each (Figure S1).

Two additional plant–bacteria modes of interaction were assessed, (i) one in which the plants and the bacteria were grown on two separate sides of Petri plates, enabling communication via volatiles only, and (ii) another where the bacterial streak was placed into the front of the primary root and for which sensing of the bacteria occurs as the root tip approaches the inoculum site. In both cases, bacterization triggered growth of plants while promoting primary root growth and branching (Figures S2 and S3). These beneficial effects could be reproduced in soil grown plants, in which root inoculation with *Achromobacter* sp. 5B1 increased whole plant height, size and productivity (Figure 3a–d).

***Achromobacter* sp. 5B1 promotes cell division in primary roots and causes changes in auxin response**

The plant hormone auxin is an important factor for root growth and architecture reconfiguration. The growth-promoting effect of the bacterium in primary roots and its relationship with cell division and auxin signaling was then analyzed using transgenic *Arabidopsis* seedlings that express *CycB1;1::uidA*, a cell cycle reporter construct and *DR5::GFP* (green-fluorescent-protein, GFP), an auxin-inducible gene marker, whose roots were placed over a bacterial streak and grown for six additional days. The results show that *Achromobacter* sp. 5B1 increases the number of cells expressing *CycB1;1::uidA* in primary root meristems (Figure 4a,b). Interestingly, confocal imaging of *DR5::GFP* expression showed an increase in auxin responsiveness in lateral root primordia (Figure 4c), but a highly contrasting expression pattern occurred in primary root meristems, as

bacterization enhanced auxin responsiveness at the very root tip while placing most fluorescence to the concave side of the coil (Figure 4d).

To gain more information on the step(s) of lateral root formation affected by inoculation with 5B1, an analysis of lateral root primordia development was performed using *Arabidopsis* transgenic seedlings that express *DR5::GUS*. Quantification of total lateral root primordia at 2, 4 and 6 days after inoculation showed that bacterization decreased the number of primordia with time, which correlated with an increased number of mature lateral roots (Figure S4). Representative images of the primordia at different developmental stages confirmed an increase in auxin responsiveness in inoculated seedlings at all the stages analyzed (Figure S4). These data suggest that an inoculation-induced increase in lateral root formation is due to an enhancement of primordium development, or emergence rate from the primary root, which are correlated with an auxin response.

***Achromobacter* sp. 5B1 causes primary root growth deviation from gravity and leads to asymmetrical *DR5::GFP* distribution expanding into one side within lateral cap cells**

The primary roots of *Arabidopsis* seedlings inoculated with *Achromobacter* sp. 5B1 deviate from the gravity vector and had an increased skewing/coiling (Figure S1). To determine if this growth pattern could be related to an altered gravitropic response, and clarify the role of auxin in this process, a number of the *Arabidopsis* seedlings expressing *DR5::GFP* were inoculated with the 5B1 strain and the proportion of agravitropic roots quantified. While all seedlings manifested root deviation, nearly 80% of the bacterized

seedlings formed any root coil (Figure 5a–c). Interestingly, during root coiling, all seedlings manifested a *DR5:GFP* gradient preferentially expressed at the concave side of the

coils. Moreover, an analysis of the roots at different stages during the curvature clearly supported the correlation between changes in auxin-inducible gene expression and

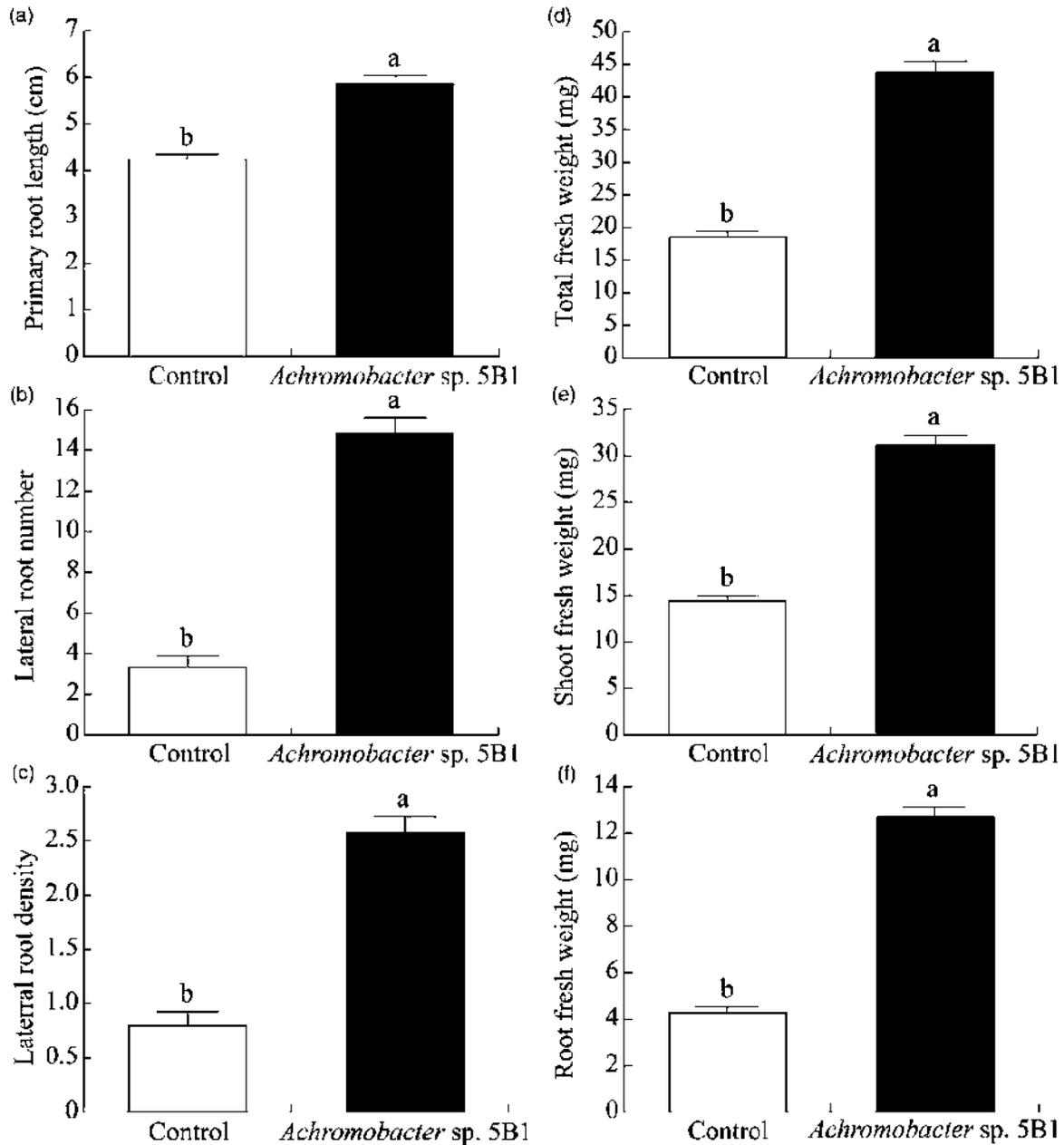


Figure 2. Effects of *Achromobacter* sp. 5B1 on root architecture and biomass production in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Arabidopsis* wild-type (Col-0) seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2× MS medium, and 4 days after germination, transferred to fresh media by placing the roots over a streak of bacteria and grown for six additional days. (a) primary root length, (b) lateral root number, (c) lateral root density (number of roots per cm of root), (d) total fresh weight, (e) shoot fresh weight and (f) root fresh weight. Values shown represent the mean ± SD ($n = 18$). Different letters indicate statistical differences from a Tukey analysis ($P < 0.05$). Experiment was repeated three times with similar results.

Figure 3. Effect of *Achromobacter sp. 5B1* on growth and seed production of *Arabidopsis* plants in soil.

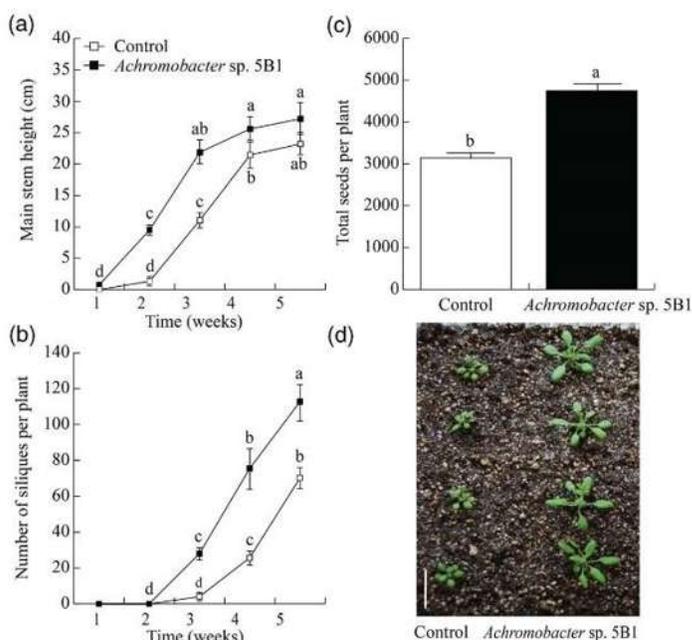
Wild-type (Col-0) seedlings were inoculated by placing their roots over a bacterial streak and maintained in the interaction during 6 days. Seedlings were transplanted into plastic boxes containing sterilized soil comprised of peat moss, perlite and vermiculite mix, and maintained to field capacity by irrigation with distilled water until the end of the life cycle.

(a) Main stem height.

(b) Number of siliques per plant.

(c) Total seeds per plant.

(d) Representative photograph of plants at the rosette stage, 7 days after transfer to soil. Values shown represent the mean \pm SD ($n = 12$). Different letters indicate statistical differences from a Tukey analysis ($P < 0.05$). Experiment was repeated twice with similar results.



root coiling (Figure 5c). These data indicate that the altered pattern of *DR5:GUS* expression in primary root tips may be responsible for the skewing/coiling behavior displayed in the presence of the bacterium.

***Achromobacter sp. 5B1* represses expression of auxin transporters PIN1, PIN2 and PIN7 in root tip and enhances expression of PIN3 in columella cells**

Auxin is redistributed within the meristem and root elongation zones through several members of the PIN family of auxin transporters (Blilou *et al.*, 2005). To define the possible roles of PIN1, PIN2, PIN3 and PIN7 in the redistribution of auxin following bacterial colonization, confocal imaging was performed in *Arabidopsis* transgenic seedlings expressing *pPIN1::PIN1-GFP*, *pPIN2::PIN2-GFP*, *pPIN3::PIN3-GFP* and *pPIN7::PIN7-GFP* in plants grown under axenic conditions or co-cultivated with *Achromobacter sp. 5B1*. Representative images of GFP expression (Figure 6a) and relative fluorescence intensity quantitation in the meristem and columella (Figure 6b,c) showed that root colonization with *Achromobacter sp. 5B1* strongly repressed PIN1 and PIN7 expression in vascular tissue, and PIN2 in the epidermis and cortex of the root tip. Noteworthy, PIN3 expression was activated in the lower root cap columella cells relative to the control (Figure 6a,c). This result implies a complex influence of the bacterium on the PINs and did not rule out the possibility that 5B1 treatment changes the localization of these transporters.

Brefeldin A affects root curling and lateral root formation promoted by *Achromobacter sp. 5B1* and disrupts bacterial-mediated auxin redistribution within the root tip

Root growth and architectural changes are mediated by the distribution of auxin transporters into the plasma membrane, which requires vesicle transport from the cytoplasm to the membrane (Geldner *et al.*, 2001, 2003). Brefeldin A (BFA) is an inhibitor widely used to alter PIN protein localization to root cell membranes by inducing their intracellular accumulation (Paponov *et al.*, 2019). Next, the interaction between *Arabidopsis* and *Achromobacter sp. 5B1* was assessed in medium supplemented with 0, 5 and 10 μ M BFA. BFA treatment inhibited primary root growth, root curling and lateral root formation in bacterized WT seedlings (Figure S5), which coincided with decreased expression of PIN1, PIN3 and PIN7 in provascular cells (Figure S6) and disrupted *DR5:GFP* distribution within the primary root cap (Figure 7a–d). These data suggest that major changes in root architecture elicited by the bacterium are affected by BFA, which blocks vesicle trafficking and auxin transport.

Disruption of auxin transport or signaling affects *Achromobacter sp. 5B1* root growth promotion and enhances root curling

Auxin transport and signaling play critical roles in root growth and gravitropic responses (Brand *et al.*, 2012). To determine at the genetic level the contribution of the auxin transport and signaling pathways in root growth

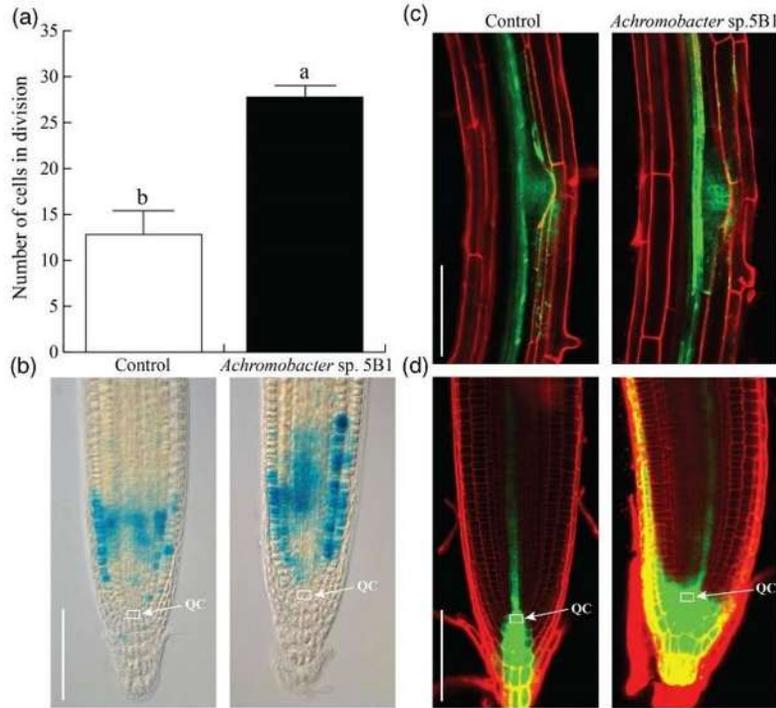


Figure 4. Effects of *Achromobacter sp. 5B1* on cell division and auxin response in roots of *Arabidopsis* seedlings.

Transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing *CycB1;1::uidA* and *DR5::GFP* were germinated and grown on agar-solidified 0.2× MS medium, and 4 days after germination, transferred to fresh media by placing the roots over a streak of bacteria and grown for six additional days, and then processed to analyze *GUS* and *GFP* expression.

(a) Number of cells expressing *CycB1;1::uidA* in primary root meristems.

(b) Representative images of root meristems showing *CycB1;1::uidA* expression.

(c) Confocal imaging of *DR5::GFP* expression in lateral root primordia and (d) the primary root tip of plants. Quiescent center (QC) position within the primary root tip is indicated by white arrow. Values shown represent the mean ± SD ($n = 20$). Different letters indicate statistically significant differences from a Tukey analysis ($P < 0.05$). Experiment was repeated three times with similar results.

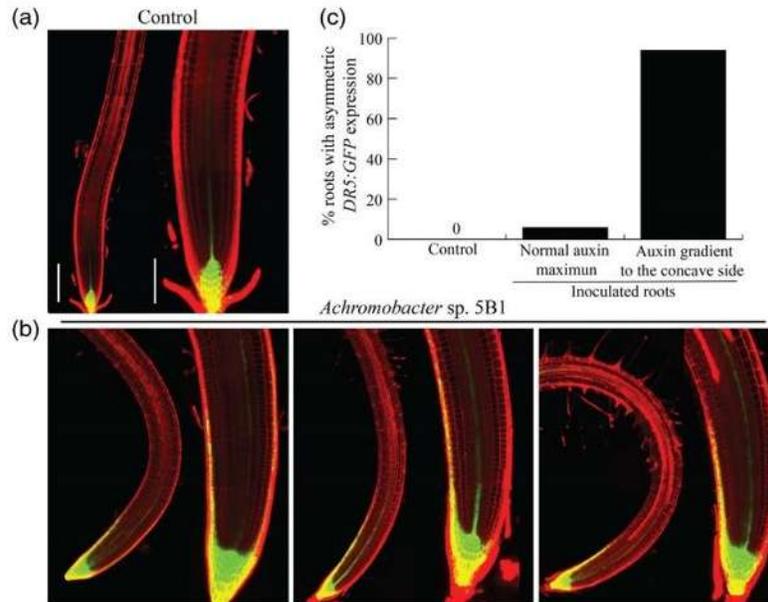
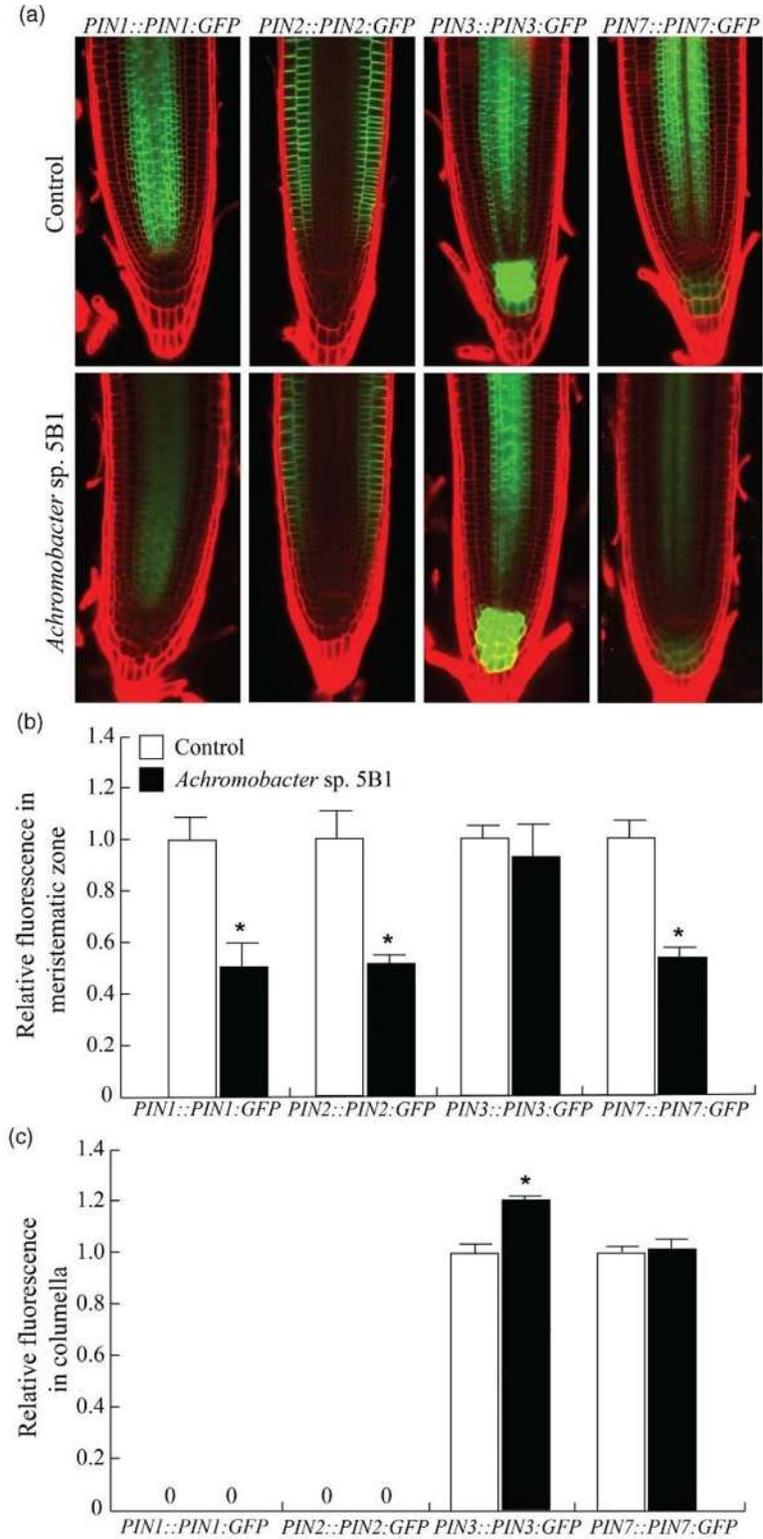


Figure 5. *DR5::GFP* expression in root tips of plants inoculated with *Achromobacter sp. 5B1*.

(a,b) Confocal photomicrographs of *DR5::GFP* expression pattern in (a) control plants and (b) in plants inoculated with *Achromobacter sp. 5B1*. Representative images in (b) show how the auxinic signal is progressively diverted to the concave side of the root tip during the coiling process. Images show independent roots during the coiling process, imaged at different times during growth. Close-up images are from the same root.

(c) Graph shows percentage of plants ($n = 18$) inoculated with the bacterium that exhibit this deviation of the auxinic signal towards the concave side of root coil. All inoculated roots showed asymmetrical expression gradient with activation on the concave side. Experiment was repeated in triplicate with similar results. Scale bars represent 200 and 100 μm , respectively.

Figure 6. *Achromobacter* sp. 5B1 represses expression of auxin transporters in provascular cells. (a) Representative images of Arabidopsis seedlings expressing *pPIN1::PIN1-GFP*, *pPIN2::PIN2-GFP*, *pPIN3::PIN3-GFP* and *pPIN7::PIN7-GFP* in plants grown under axenic conditions or co-cultivated with *Achromobacter* sp. 5B1. (b,c) Graphs show the relative fluorescence intensity at (b) the meristem and (c) columella cells. Photographs show representative individuals of at least 10 seedlings. Asterisks indicate that means are statistically different at $P < 0.05$. Experiment was repeated two times with similar results. Scale bar: 50 μ m.



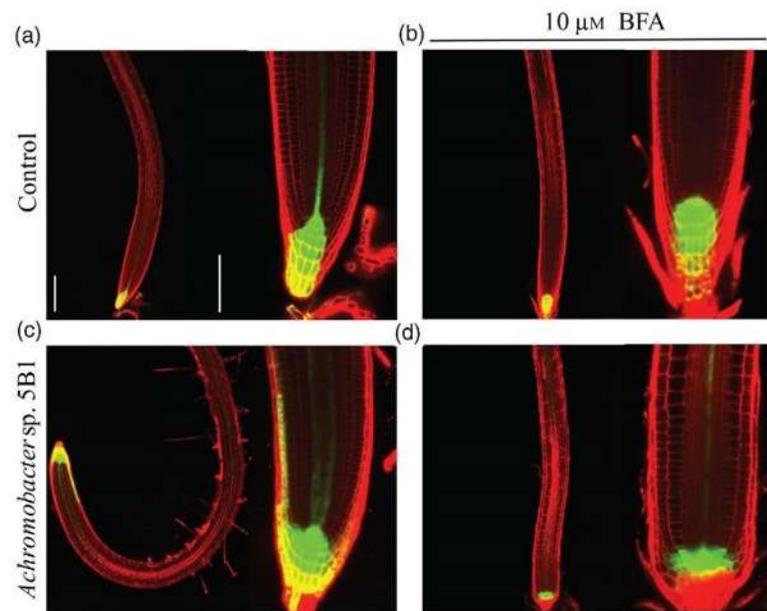


Figure 7. Effect of brefeldin A (BFA) and *Achromobacter* sp. 5B1 in the expression pattern of *DR5:GFP* at the root tip of *Arabidopsis thaliana*.

(a) In axenic conditions the expression pattern of *DR5:GFP* is observed in the provascular tissue, quiescent center and in columella

(b) Brefeldin A (BFA) blocks auxin transport in provascular tissue and promotes accumulation in columella as evidenced by the increase in signal intensity in this area.

(c) *Achromobacter* sp. 5B1 changes the direction of growth and triggers the *DR5:GFP* signal redistribution to the concave side of coils.

(d) When plants are treated with BFA and co-inoculated with *Achromobacter* sp. 5B1, BFA prevents auxin redistribution. Images shown are representative of 18 plants analyzed per treatment. Scale bars shown represent 200 and 100 μm , respectively.

promotion and lateral root formation elicited by *Achromobacter* sp. 5B1, the response of WT (Col-0) seedlings and mutants defective on auxin transport *eir1-1* and *aux1-7*, or response *tir1-1*, *axr1-3*, *slr1-1*, *arf7-1arf19-1* and *tir1-1afb2-3afb3-4* were compared. In plants transferred to fresh media with or without a streak of bacterial inoculum for 6 days, the promotion of root branching was decreased in auxin transport-related mutants, *eir1-1* and *aux1-7* (Figure 8a–d). Nevertheless, these mutants still responded to bacterization and therefore the main difference between mutants and WT seedlings seems to be that the mutants display fewer lateral roots in the absence of an inoculum. A comparable lateral root response was observed for *tir1-1* mutants. Indeed, the bacterium repressed primary root growth in *tir1-1*, *axr1-3*, *slr1-1* and *tir1-1afb2-3afb3-4* mutants. Noteworthy, the primary roots of these mutants had an exaggerated deviation of growth from the gravity response vector and their root tips curled synchronously (Figures 8d and 9a–d). Close-up images from *Arabidopsis* WT and *tir1afb2afb3* primary root tips, show that in the WT as the root navigates over the medium, lateral roots are stimulated to emerge and grow, and thus more branches are formed, whereas in *tir1afb2afb3* mutants, the primary roots develop excessive curling and fail to form lateral roots (Figure S7). This latter response could simply be the consequence of a pleiotropic effect of mutating three auxin receptors on early lateral root primordium initiation.

***Achromobacter* sp. 5B1 improves growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress**

Achromobacter sp. 5B1 was isolated from roots of Mesquite trees that can grow under high salt conditions. To

investigate any possible relevance of the bacterium to plants growing under salt stress, the growth and development of *Arabidopsis* seedlings in medium with increasing salt concentrations was tested *in vitro*, using Petri plates. An initial screening of the growth response included concentrations of 0, 50, 100 and 150 mM NaCl. Salt supplements affected lateral root formation and shoot, root and total biomass production with the 150 mM concentration being highly toxic (Figure S8). From this analysis, we decided to test the responses of axenic and bacterized seedlings to 0 and 100 mM salt supplements. Although primary root growth was similarly inhibited by salt in control and inoculated seedlings, the formation of lateral roots was maintained and the shoot, root and total fresh weight was improved by the bacterium under salt conditions (Figure 10), which indicates a possible functional relevance of the plant probiotic effects of *Achromobacter* sp. 5B1 not only under standard growth conditions but also to resist salinity.

DISCUSSION

Achromobacter species are aerobic gram-negative bacteria with a wide distribution throughout freshwater and soil environments. *Achromobacter xylosoxidans* shows a certain level of nitrogenase activity, indole acetic acid production and P solubilization, and any or some of these traits may account for the plant growth properties of the genus (Jha and Kumar, 2009). However, little is known about how these microbes interact with plants to improve their adaptation to biotic and/or abiotic stress. A major plant response of *Arabidopsis* to root colonization with *Achromobacter* sp. 5B1 was the reconfiguration of root

architecture, characterized by an enhanced primary root growth followed by increasing formation of lateral roots, and these traits could be observed in three plant-bacteria co-cultivation systems: (i) in roots placed over a bacterial

streak, (ii) in plants and bacteria co-cultivated on separated sides of a divided Petri plate, and (iii) placing the bacteria in front of the growing primary root. Thus, plants would greatly benefit from inoculation with selected

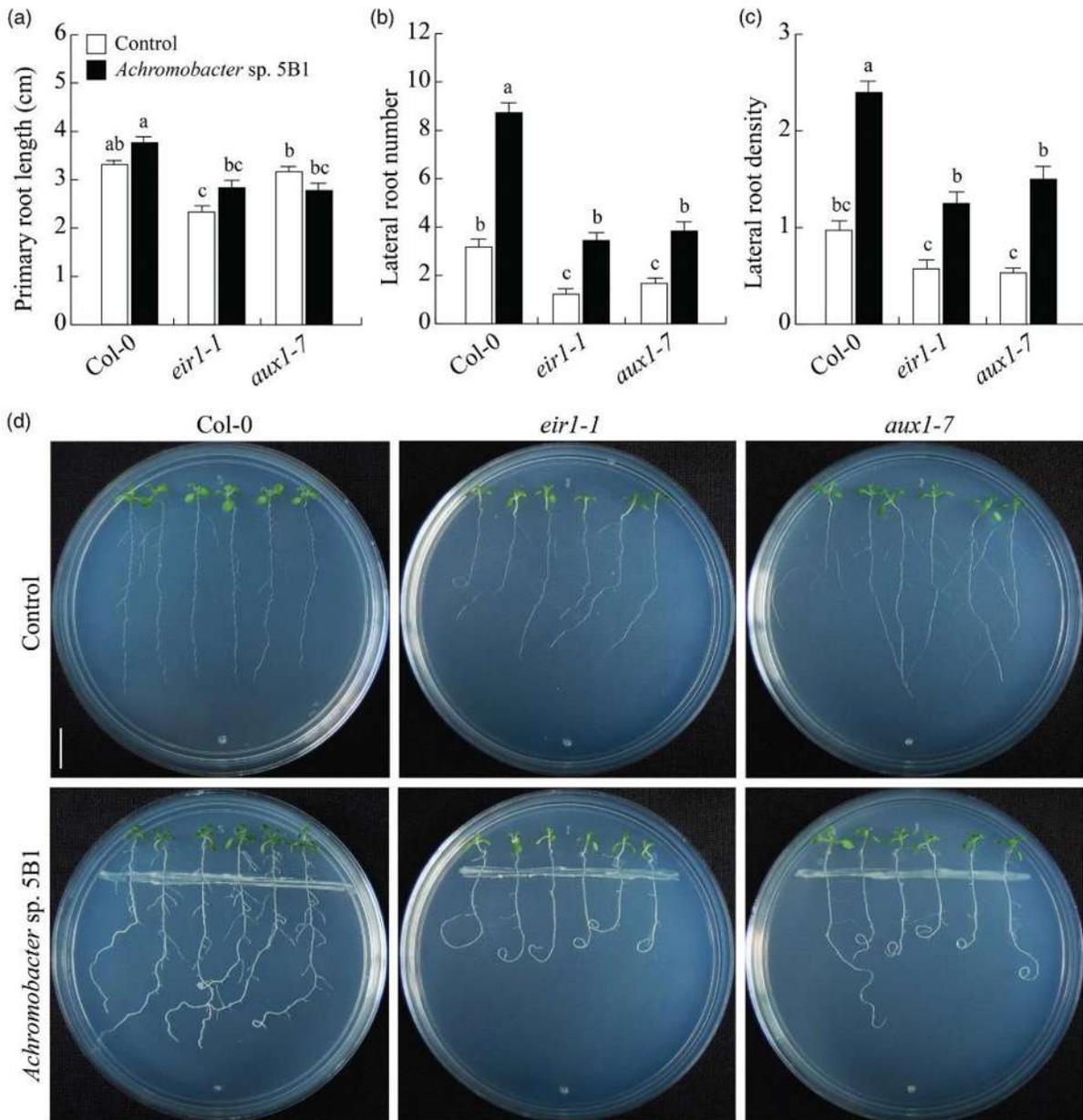


Figure 8. Root response of Arabidopsis wild-type and auxin transport-related mutants to colonization by *Achromobacter* sp. 5B1. Wild-type (Col-0) and mutants *eir1-1* and *aux1-7* were germinated and grown on agar-solidified 0.2× MS media, 4 days after germination, transferred to new media with or without a streak of bacterial inoculum for six additional days. (a) Primary root length. (b) Lateral root number. (c) Lateral root density. (d) Representative images of Col-0 and mutant seedlings in control condition and 5B1 treatment (scale bar = 1 cm). Values shown represent the mean ± SD ($n = 18$). Different letters indicate statistical differences from a Tukey analysis ($P < 0.05$). Experiment was repeated three times with similar results.

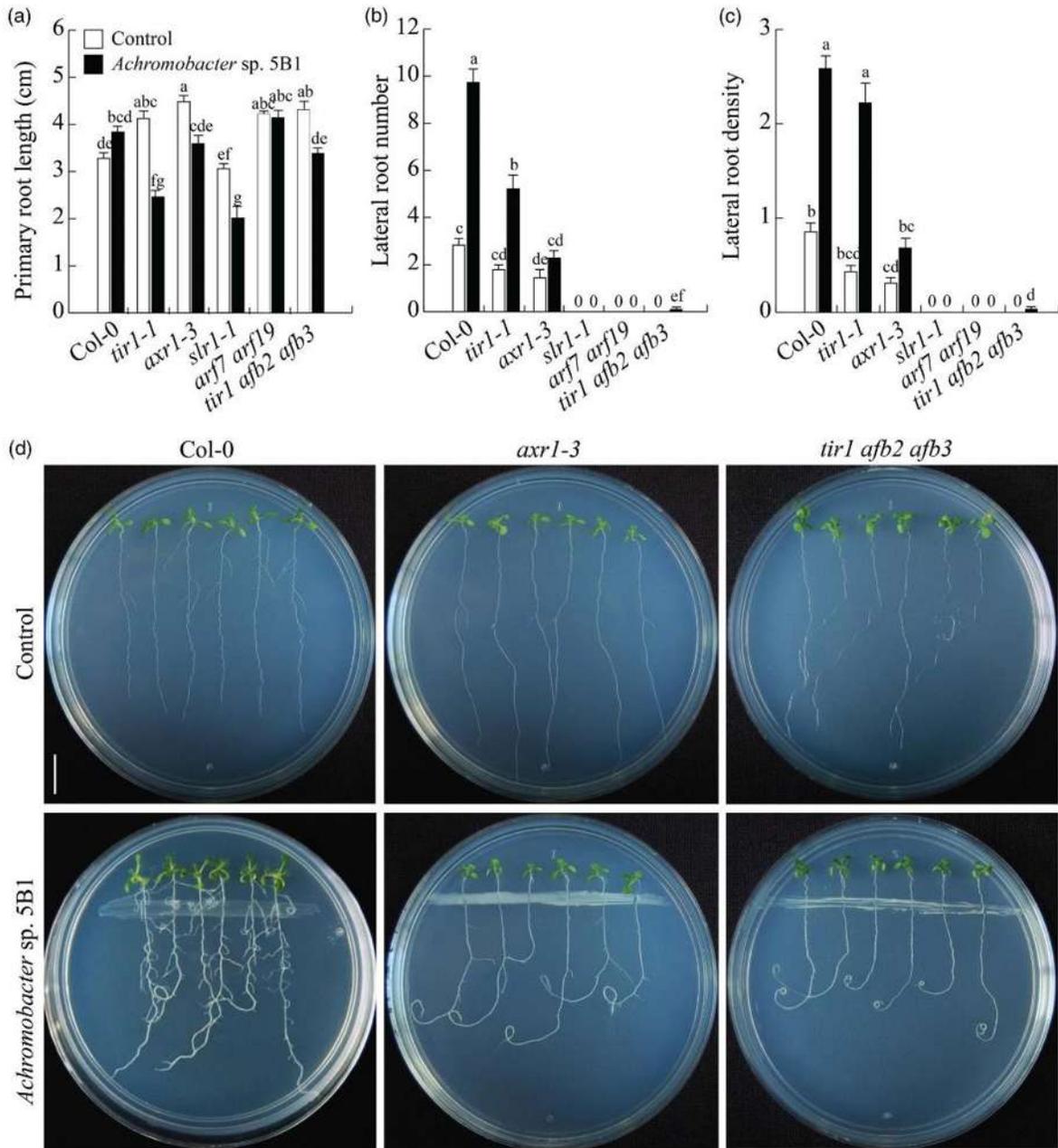


Figure 9. Root response of *Arabidopsis* wild-type and auxin signaling mutants to colonization by *Achromobacter* sp. 5B1. Wild-type (Col-0) and mutants *tir1-1*, *axr1-3*, *slr1-1*, *arf7-1arf19-1* and *tir1-1afb2-3afb3-4* seedlings were germinated and grown on agar-solidified 0.2× MS media, 4 days after germination, transferred to new media with or without a streak of bacterial inoculum for six additional days. (a) Primary root length. (b) Lateral root number. (c) Lateral root density. (d) Representative images of Col-0, *tir1-1afb2-3afb3-4* and *axr1-3* in control condition and 5B1 treatment (scale bar = 1 cm). Values shown represent the mean ± SD ($n = 18$). "0" in graphs is used to indicate "0 values." Different letters indicate statistical differences from a Tukey analysis ($P < 0.05$). Experiment was repeated three times with similar results.

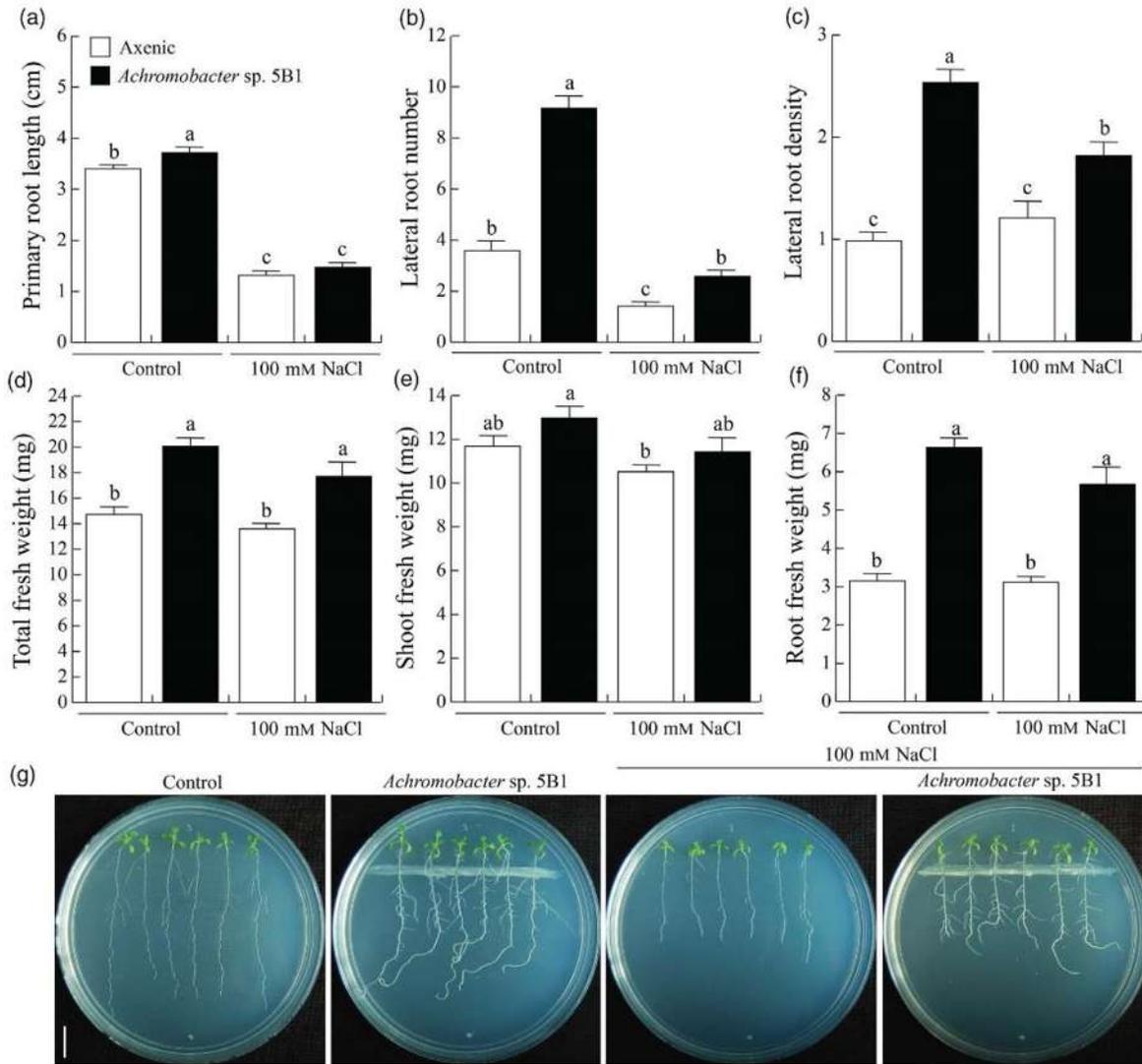


Figure 10. Root architectural response and biomass production of *Arabidopsis* plants in co-inoculation with *Achromobacter sp. 5B1* in salinity conditions. Wild-type *Arabidopsis* (Col-0) seedlings were germinated and grown in solidified MS medium with 0.2% agar and supplemented with 100 mM NaCl, 4 days after germination, transferred to fresh media with or without a streak of bacterial inoculum for six additional days. (a) Primary root length, (b) lateral root number, (c) lateral root density, (d) total fresh weight, (e) shoot fresh weight and (f) root fresh weight. (g) Representative images of plates are shown. Values represent the mean \pm SD ($n = 18$). Different letters indicate statistical differences from a Tukey analysis ($P < 0.05$). Experiment was repeated three times with similar results. Scale bar: 1 cm.

Achromobacter strains, which clearly behave as probiotics both *in vitro* and in an artificial soil as substrate.

Root branching is a highly desirable trait in the search of more cheap, efficient and sustainable agriculture and therefore rhizobacteria application is a promising option to reach this goal. Our results show that *Achromobacter sp. 5B1* promotes primary root growth and at the same time, it increases root branching via inducing the maturation of lateral root primordia, aspects that differ from the halted

root growth caused by other root-associated bacteria. In previous reports, *Arabidopsis* seedlings were inoculated *in vitro* with rhizobacteria from several genera, including *Bacillus* and *Pseudomonas*, which manifest halted primary root growth upon sensing of bacterial volatiles or diffusible molecules, and then lateral root growth is stimulated as a compensatory mechanism (López-Bucio *et al.*, 2007; Gutiérrez-Luna *et al.*, 2010; Zamioudis *et al.*, 2013; Stringlis *et al.*, 2018). In this regard, the primary root growth

response to *Achromobacter* sp. 5B1 seems to be unique, and apparently related more to the changes in root navigation that primes roots for enhanced lateral root development, as the induction of lateral roots occurs even when the growth of the main root axis remains dominant.

Interestingly, agravitropic root tip behavior could be only evidenced in roots colonized by the bacteria, but not in plants exposed to volatile organic compounds released by the bacteria on divided Petri plates or when the bacterial streak was placed in front of their growing roots. These results did not support the notion that volatile or diffusible molecules were responsible for the deviation of root growth during the interaction, and therefore an unknown bacterial signature, possibly a microbe-associated molecular pattern or pathogen-associated molecular pattern already present upon physical plant–bacteria contact may explain this particular root behavior. This is based on the assumption that bacterial physiology is constant whether or not it colonizes roots. However, an alternative explanation is that the bacteria colonizing roots have a different physiology and may release compounds that induce root coiling only under this condition.

Root movements are difficult to appreciate as they occur below ground; nevertheless, the study of gravitropism and hydrotropism shed light on the molecular and physiological aspects of root behavior, and these are tightly linked to the phytohormones, auxin and abscisic acid, respectively (Falik *et al.*, 2005; Oliva and Dunand, 2007; Harmer and Brooks, 2018). *Achromobacter* sp. 5B1 influences at least two critical aspects during root architecture reconfiguration, i.e., (i) it enhances auxin responsiveness in lateral root primordia, which correlates with a more efficient emergence of the primordia from the primary root, and (ii) changes the expression of auxin transporters within the primary root tip. Although both responses rely to some level upon auxin signaling, they likely operate via at least two highly contrasting mechanisms, as comparison of primary root growth and lateral root formation in WT and auxin transport or signaling mutants *eir1-1*, *aux1-7*, *tir1-1*, *axr1-3*, *slr1-1*, *arf7-1arf19-1* and *tir1-1afb2-3afb3-4* showed that *eir1-1* and *aux1-7* still respond significantly to inoculation with 5B1 by increased production of lateral roots. The main difference appears to be that the mutants displayed fewer lateral roots even in the absence of an inoculum. Similarly, the *tir1* mutation seems to affect only minimally the induction of lateral root formation by 5B1 inoculation. On the other hand, the primary root growth response to 5B1 inoculation depends upon auxin transport and signaling through *PIN2* and *AUX1* because mutating these genes exacerbates primary root curling, a trait also manifested in auxin signaling mutants.

Auxin transport is possible through the coordinated action of several members from the PIN family of auxin transporters. Our study shows that auxin-responsive gene expression evidenced by *DR5:GFP* shifts from the center of

the primary root (columella initials) to the concave side of the curling root in inoculated plants and this certainly accounts for the deviation of root growth. Confocal imaging revealed the repression of *PIN1* and *PIN7* in the provasculature during root navigation elicited by *Achromobacter* sp. 5B1. BFA, a compound that represses the vesicle efflux necessary to place the PIN proteins to the plasma membrane, disrupted root coiling and lateral root formation induced by the 5B1 strain and this was correlated with the halt of *DR5:GFP* redistribution within the root cap. This suggests that the bacterium disrupts the gravitropic response in roots, which may depend on the complex network of PIN proteins acting in concert. Consistently, whereas detection of *PIN1* and *PIN7* is decreased in root provasculature, *PIN3* expression was activated in the lower root cap columella cells. It was somewhat surprising that long-term (6 days) BFA treatments decreased *PIN1*, *PIN2* and *PIN7* expression, which differs from previous reports in which BFA treatment induced internalization of *PIN1* and *PIN2* proteins by inhibiting recycling (Geldner *et al.*, 2003). Importantly, when the effects of BFA treatments on *PIN1* localization were investigated in previous reports, Arabidopsis seedlings were treated with BFA for about 1 h (Paciorek *et al.*, 2005; Paponov *et al.*, 2019), whereas in the current research the roots were exposed to BFA for 6 days, and thus this long-term effect is different to short time treatments. Thus, the possibility that changes in *PIN-GFP* signals were dependent on changes of localization of PIN proteins cannot be ruled out.

The auxin transport mutants *eir1-1* and *aux1-7*, which are defective in the *PIN2* auxin efflux transporter, or in the auxin intake permease *AUX1*, respectively, had a supercoiling phenotype, similar to that of auxin signaling mutants. These data indicate that the agravitropic root behavior may be caused by a defective auxin transport to growing parts of the root, namely the meristem and elongation zones, because auxin signaling mutants showed halted primary root growth response when compared with the WT, in which growth was promoted. The fact that the bacterium still causes an increase in root branching in *tir1-1* and *axr3-1*, the only two auxin response mutants that showed some capacity to form lateral roots in control conditions, indicates an auxin-independent mechanism in mediating lateral root maturation by 5B1. The results that some of the other mutants including *slr1-1*, *arf7-1arf19-1* and *tir1-1afb2-3afb3-4* did not show a promotion could simply be the consequence of a pleiotropic effect on early lateral root primordium initiation.

Achromobacter sp. 5B1 was isolated from Mesquite plants growing in a saline soil and it was possible that as part of the natural bacterial populations, it could contribute to an improved nutrient acquisition by modifying root signaling and/or growth patterning or even might confer salt or drought tolerance. Our data support this latter

hypothesis, as Arabidopsis seedlings inoculated with the bacterium grew better under salt supplements than the axenically grown seedlings. Recent research identified two halophilic bacteria as *Bacillus* sp. and *Pseudomonas lini* that promoted growth under standard and saline conditions in Arabidopsis, cucumber and water melon, and thus rhizobacteria from extreme environments may extend their probiotic traits to horticultural species (Palacio-Rodriguez *et al.*, 2017; Fitzpatrick *et al.*, 2018). As *Achromobacter* sp. 5B1 influences root tip navigation, plant behavior and environmental adaptation, it is possible that other functional adaptive processes such as obstacle avoidance may depend upon the composition of the microbiomes, further research is needed to unveil how these dynamic responses contribute to plant fitness.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Rhizosphere sampling and isolation of rhizobacteria

Bacterial isolates were collected from roots of Mesquite plants (*Prosopis* sp.) growing at a location called "Poza Salada" in the Sobaco Valley, southeast of the Chihuahuan Desert in Coahuila state, México (26°10'54" N and 102°42'24" W). The Poza Salada is a natural sinkhole with saltwater and the surrounding saline soil with EC 10.12 mS cm⁻¹ and pH 8.61. The sampling was conducted in April 2015. Roots were washed, disinfected with 1% sodium hypochlorite and 70% ethanol, rinsed five times with sterile 0.5× phosphate-buffered saline solution, and then macerated in a mortar with 9 ml of phosphate-buffered saline 0.5× solution for endosphere bacteria isolation. For rhizosphere sampling, 10-fold serial dilutions were made and aliquots (100 µl) were plated on media with a contrasting composition: free nitrogen, King B and LB supplemented with 3% NaCl. The plates were incubated at 30°C for 1–3 days, and bacteria were isolated based on colony morphology, propagated in their respective culture media and maintained in 30% glycerol solution at -80°C.

Analysis of the 16S rRNA gene from 5B1 strain

The bacterial isolate 5B1 was grown in LB broth overnight and subsequently DNA isolation was performed as previously described with some modifications (Sambrook *et al.*, 1989). The universal primers 341 forward (341Fw; 5'-AGCGGGGAGGAAGGAGTAAA-3') and 1061 reverse (1061Rv; 5'-ATCGTCAGCTCGTGTGTGA-3') were used to amplify the gene encoding the 16S subunit of ribosomal RNA (16S rRNA gene). The mixture for each reaction was prepared using 32.25 µl of H₂O, 10 µl of 5× Colorless GoTaq³ Reaction Buffer, 2.5 µl of MgCl₂ (1.5 mM), 1 µl of 341Fw (10 µM), 1 µl of 1061Rv (10 µM), 1 µl of dNTPs (10 mM), 0.25 µl of Taq polymerase to obtain 2.5 units per reaction and 2 µl of DNA (100 ng µl⁻¹) from the bacteria: 5B1 strain. The amplification conditions were a denaturation step at 95°C for 2 min, then for 30 cycles: a denaturation at 95°C for 1 min, an alignment at 60°C for 1 min, amplification at 72°C and finally an extension step at 72°C for 3 min (Weisburg *et al.*, 1991). Three microliters of each amplification product were mixed with 2 µl of Gel Red™ and 5 µl of H₂O, each sample was charged on a 1% agarose horizontal slab gel with TAE 1× and then an electrophoresis was performed at 90 V for 45 min. Subsequently, polymerase chain reaction products were purified using the UltraClean polymerase chain reaction Clean up Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA,

USA) and were sent for sequencing to Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO, Irapuato, Gto, México). The sequence of 16S rRNA gene from 5B1 was used to download sequences with 99% similarity using the BLAST algorithm from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and all sequences were employed to build the phylogenetic tree in MEGA7 software (<http://www.megasoftware.net/download> form) using the neighbor-joining method with 100 bootstrap replications (Felsenstein, 1985; Saitou and Nei, 1987; Kumar *et al.*, 2016). Genetic distances among tree sequences were estimated with the Kimura two-parameter model (Kimura, 1980), and the trees were constructed by randomly adding 10 sequences (10 repetitions) (Nei and Kumar, 2000).

Plant material and growth conditions

WT *A. thaliana* seeds (ecotype Columbia-0, Col-0) and mutants *air1 1* (Roman *et al.*, 1995), *aux1 7* (Pickett *et al.*, 1990), *tir1 1* (Parry *et al.*, 2009), *tir1-1afb2-3afb3 4* (Parry *et al.*, 2009), *axr1-3* (Estelle and Somerville, 1987), *str1-1* (Fukaki *et al.*, 2002) and *arf7-1arf19-1* (Okushima *et al.*, 2006), besides transgenic lines *CycB1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *DR5::GFP* (Ottensschläger *et al.*, 2003), *pPIN1::PIN1-GFP* (Benkova *et al.*, 2003), *pPIN2::PIN2-GFP*, *pPIN3::PIN3-GFP* and *pPIN7::PIN7-GFP* (Bililou *et al.*, 2005), were used in the different experiments. Seeds were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 4 min and 10% (w/v) commercial chloride solution for 4 min. After five washes with sterile distilled water, seeds were incubated in darkness at 4°C for 48 h in sterilized distilled water. Seeds were sown on plates containing 0.2× Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS salts) supplemented with 0.6% (w/v) sucrose and 1% (w/v) phytagar, pH was adjusted at 7.0. The suggested formulation of MS salts is 4.3 g L⁻¹ for a 1× concentration, then, we used 0.9 g L⁻¹ for 0.2× concentration. MS salts and phytagar were purchased from Phytotechnology Laboratories (Shawnee Mission, KS, USA), and sucrose was purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Plates with germinating seeds were incubated at a plant growth chamber (Percival Scientific AR-951, Perry, IA, USA) with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness, light intensity of 100 µmol m⁻² sec⁻¹, and temperature of 22°C.

Plant-bacteria co-cultivation

Seedlings of 4 days after germination were transferred to 0.2× MS media with or without a streak of bacterial inoculum from isolated colonies on LB solidified media. Bacteriological agar was purchased from BD Bioxon and LB broth was purchased from Phytotechnology Laboratories³. For direct contact, six seedlings per plate were located by placing their roots over the streak whereby the shoots were approximately 1 cm above the inoculum. For emission of volatile compounds, six seedlings were placed on the right side of a plate with one division and the streak on the left side. For diffusible compounds, six seedlings were located whereby their primary root tips were approximately 5 cm above the inoculum. Marks were placed on the plates at the location of the primary root tips at the transfer moment and the growth analyzed 6 days later. The plates were incubated in a plant growth chamber AR-95L (Percival Scientific) with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness, light intensity of 100 µmol m⁻² sec⁻¹ and temperature of 22°C.

The interaction between Arabidopsis and *Achromobacter* sp. 5B1 was assessed in medium supplemented with 0, 5 and 10 µM BFA. In this case, the compound was supplemented directly to the 0.2× MS growth medium before the transfer of seedlings 4 days after germination over a streak of bacterial inoculum and growth allowed for 6 additional days.

Growth in artificial soil

Seedlings 10 days after germination grown in the direct contact system described in the previous section were transferred to boxes with an artificial soil mixture composed of peat moss (Sunshine[®], Agawam, MA, USA), perlite and vermiculite with a 3:1:1 ratio, as well as 300 ml of MS 0.1× nutrient solution. Boxes with growing plants were incubated in a plant growth chamber (Percival Scientific AR-95L) with a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness, light intensity of 100 μmol m⁻² sec⁻¹ and temperature of 22°C. During the incubation period, each box was watered once a week with 300 ml of distilled sterilized water.

Histochemical analysis of GUS activity

Transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing the *uidA* (GUS) reporter gene were incubated in a microtiter plate with 0.1% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-Gluc) in a phosphate buffer at pH 7 (0.1 M NaH₂PO₄ and 0.1 M Na₂HPO₄) with 2 mM K₃Fe(CN)₆ and 2 mM K₃Fe(CN)₆ overnight at 37°C (Jefferson *et al.*, 1987). After removing X-Gluc solution, seedlings were incubated during 60 min at 62°C with an acid solution (0.24 N HCl in 20% methanol (v/v)). The acid solution was substituted with a basic solution (7% NaOH (w/v) in 60% ethanol (v/v)) for 20 min at room temperature. After throwing away the basic solution, seedlings were dehydrated with ethanol treatments at 40%, 20% and 10% (v/v) for 20 min each, and fixed with 50% glycerol (v/v) (Malamy and Benfey, 1997). X-Gluc was purchased from Phytotechnology Laboratories[®]. The fixed roots were placed on glass slips, covered with coverslips and sealed with commercial nail varnish; subsequently they were photographed with a Nomarski microscope (Leica DFC450C, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). For each treatment, 10 seedlings were analyzed.

Analysis of GFP activity

Transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing the *GFP* reporter gene were incubated in 10 mg ml⁻¹ propidium iodide over 1 min. Propidium iodide was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The seedlings were rinsed in water and mounted with 50% glycerol on glass slips and covered with coverslips. Each sample was analyzed separately for propidium iodide (with an excitation at 568 nm and an emission window at 585–610 nm) and GFP fluorescence (with an excitation at 488 nm and an emission window at 505–550 nm) using a confocal microscope (Olympus FV1200, Tokyo, Japan) after which the two micrographs were merged to produce a final image. For each treatment, 10 independent seedlings were analyzed.

Plant growth analysis

To evaluate *in vitro* growth, elongation of the primary roots during the interaction with 5B1 were measured with a ruler, and lateral roots present in this primary root segment were recorded using a stereomicroscope (Leica MZ6) at 10× magnification, and the lateral root density was calculated by dividing the lateral root number by primary root length in 18 individuals of each growth condition. The total fresh weight, shoot fresh weight and root fresh weight of six seedlings grown on the same plate were measured with an analytical balance (Ohaus, Parsippany, NJ, USA) and three plates of each growth condition were evaluated. Ten micrographs (photographs acquired in the microscope) of each growth condition were analyzed in ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) to determine how many cells expressed the reporter gene. To evaluate the growth in

soil, stem length was measured with a ruler and siliques were counted, while total seed production was calculated from the average number of seeds in 10 siliques harvested in the middle zone of shoot and total siliques in four plants of each growth condition. In all experiments, the dataset was statistically analyzed with STATISTICA 10.0 program (Dell StatSoft, Austin, Texas, USA). One-way ANOVA or two-way ANOVA were performed and then data are analyzed with the Tukey's *post hoc* test. Different letters were used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).

ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciate the kind donation of seeds by Drs. Ben Scheres, Alfredo Cruz-Ramírez, Peter Doerner, Mark Estelle, Masao Tasaka and Plinio Guzman. This work was supported by the Coordinación de la Investigación Científica UMSNH (grant 2.26) and CONACYT-Mexico (grant A1-S-34768).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

KRJV and JLB planned and designed the research. BPRA, JLCA and JSM conducted fieldwork and analyzed the data. EGC, SBO, ROC and LFRH performed the experiments, and analyzed data. KRJV, SBO and JLB wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All relevant data can be found within the manuscript and its Supporting Information.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1. Phenotype of *Arabidopsis thaliana* seedlings co-inoculated with *Achromobacter* sp. 5B1.

Figure S2. Effects of *Achromobacter* sp. 5B1 on growth and root architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in divided Petri plates.

Figure S3. Influence of *Achromobacter* sp. 5B1 co-cultivated in the front of the primary root in growth and root system architecture.

Figure S4. Development of the lateral root primordia (LRP) and lateral roots (RL) in *Arabidopsis* plants co-inoculated with *Achromobacter* sp. 5B1.

Figure S5. Effect of brefeldin A (BFA) on roots of *Arabidopsis thaliana* co-cultivated with *Achromobacter* sp. 5B1.

Figure S6. Expression pattern of PIN transporters in primary root tips of plants co-cultivated or not with *Achromobacter* sp. 5B1 and treated with brefeldin A.

Figure S7. *Achromobacter* sp. 5B1 on growth of *Arabidopsis* WT and *tir1afb2afb3* primary roots.

Figure S8. Effects of salt on root architecture and biomass production in *Arabidopsis thaliana* seedlings.

REFERENCES

- Abas, L., Benjamins, R., Malenica, N., Paciorek, T., Wiśniewska, J., Moulinier-Anzole, J.C., Sieberer, T., Friml, J. and Luschning, C. (2006) Intracellular trafficking and proteolysis of the *Arabidopsis* auxin-efflux facilitator PIN2 are involved in root gravitropism. *Nat. Cell Biol.* 8, 249–255.

- Atkinson, J.A., Rasmussen, A., Traini, R., Voss, U., Sturrock, C., Mooney, S.J., Wells, D.M. and Bennett, M.J. (2014) Branching out in roots: uncovering form, function, and regulation. *Plant Physiol.* **166**, 538–550.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jurgens, G. and Friml, J. (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, **115**, 591–602.
- Bilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K. and Scheres, B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature*, **433**, 39–44.
- Brand, L.R., Wells, D.M., Larrieu, A. et al. (2012) Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, 4668–4673.
- Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K. et al. (2012) Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, **488**, 91–95.
- Chen, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, T. and Masson, P.H. (1998) The Arabidopsis thaliana AGRATROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 15112–15117.
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T. and Doerner, P. (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* **20**, 503–508.
- Dharmasiri, S., Swarup, R., Mockaitis, K. et al. (2006) AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science*, **312**, 1218–1220.
- Dietrich, D. (2018) Hydrotropism: how roots search for water. *J. Exp. Bot.* **69**, 2759–2771.
- Effendi, Y., Radatz, K., Labusch, C., Rietz, S., Wimalasekera, R., Helizon, H., Zeidler, M. and Scherer, G.F. (2014) Mutants of phospholipase A (pPLA-I) have a red light and auxin phenotype. Mutants of phospholipase A (pPLA-I) have a red light and auxin phenotype. *Plant Cell Environ.* **37**, 1626–1640.
- Estelle, M.A. and Somerville, C. (1987) Auxin-resistant mutants of Arabidopsis with an altered morphology. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 200–206.
- Falik, O., Reides, P., Gersani, M. and Novoplansky, A. (2005) Root navigation by self-inhibition. *Plant Cell Environ.* **28**, 567–569.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 778–791.
- Fitzpatrick, C.R., Copeland, J., Wang, P.W., Guttman, D.S., Kotanen, P.M. and Johnson, M.T.J. (2018) Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **115**, E1157–E1165.
- Fukaki, H., Tamada, S., Masuda, H. and Tasaka, M. (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J.* **29**, 163–168.
- Geisler, M., Wang, B. and Zhu, J. (2014) Auxin transport during root gravitropism: transporters and techniques. *Plant Biol.* **16**, 50–57.
- Goldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jurgens, G. and Palme, K. (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, **413**, 425–428.
- Goldner, N., Anders, N., Walters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Müller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A. and Jurgens, G. (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin dependent plant growth. *Cell*, **112**, 219–230.
- Gutiérrez-Luna, F.M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., Reyes de la Cruz, H. and Macías-Rodríguez, L. (2010) Plant growth promoting rhizobacteria modulate root system architecture in Arabidopsis thaliana through volatile organic compound emission. *Symbiosis*, **51**, 75–83.
- Harmer, S.L. and Brooks, C.J. (2018) Growth mediated plant movements: hidden in plain sight. *Curr. Opin. Plant Biol.* **41**, 89–94.
- Jha, P. and Kumar, A. (2009) Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium Achromobacter xylosoxidans from wheat plant. *Microb. Ecol.* **58**, 179–188.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901–3907.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111–120.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**, 1870–1874.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Müller, D. and Moënne-Loccoz, Y. (2017) Let the core microbiota be functional. *Trends Plant Sci.* **22**, 583–595.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernández-Calderón, E., Velásquez-Becerra, C., Farias-Rodríguez, R., Macías-Rodríguez, L.I. and Valencia-Cantero, E. (2007) Bacillus megaterium rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin and ethylene-independent signaling mechanism in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 207–217.
- Lugtenberg, B. and Kamilova, F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 541–558.
- Luschig, C., Gaxiola, R.A., Grisafi, P. and Fink, G.R. (1998) EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana. *Genes Dev.* **12**, 2175–2181.
- Matamy, J.E. and Benfey, P.M. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development*, **124**, 33–44.
- Marchant, A., Kargul, J., May, S.T., Müller, P., Delbarre, A., Perrot-Rechenmann, C. and Bennett, M.J. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* **18**, 2066–2073.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. and Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J.* **17**, 6903–6911.
- Nei, M. and Kumar, S. (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York, United States of America: Oxford University Press.
- Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K. et al. (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in Arabidopsis thaliana: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell*, **17**, 444–463.
- Oliva, M. and Dunand, C. (2007) Waving and skewing: how gravity and the surface of growth media affect root development in Arabidopsis. *New Phytol.* **176**, 37–43.
- Ortiz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M. and López-Bucio, J. (2008) N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ.* **31**, 1497–1509.
- Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., del Río, R., Campos-García, J. and López-Bucio, J. (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **108**, 7253–7258.
- Ottenslänger, I., Wolff, P., Wolvertson, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M. and Palmer, K. (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 2987–2991.
- Paciorek, T., Zazimalová, E., Ruthardt, N. et al. (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, **435**, 1251–1256.
- Palacio-Rodríguez, R., Coria-Arellano, J.L., López-Bucio, J., Sánchez-Salas, J., Muro-Pérez, G., Castañeda-Gaytán, G. and Sáenz-Mata, J. (2017) Halophilic rhizobacteria from Distichlis spicata promote growth and improve salt tolerance in heterologous plant hosts. *Symbiosis*, **73**, 179–189.
- Paponov, I.A., Friz, T., Budnyk, V., Teale, W., Wüst, F., Paponov, M., Al-Babil, S. and Palma, K. (2019) Natural auxin does not inhibit Brefeldin A induced PIN1 and PIN2 internalization in root cells. *Front. Plant Sci.* **10**, 514.
- Parry, G., Calderon-Villalobos, L.L., Prigge, M., Perot, B., Dharmasiri, S., Itoh, H., Lechner, E., Gray, W.M., Bennett, M. and Estelle, M. (2009) Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 22540–22545.
- Pérez-Flores, P., Valencia-Cantero, E., Altamirano-Hernández, J., Pelagio-Flores, R., López-Bucio, J., García-Juárez, P. and Macías-Rodríguez, L. (2017) Bacillus methylotrophicus MA-96 isolated from maize (Zea mays) rhizosphere increases growth and auxin content in Arabidopsis thaliana via emission of volatiles. *Protoclasma*, **254**, 2201–2213.
- Perreineau, F., Wimalasekera, R., Effendi, Y. and Scherer, G.F. (2016) Inhibition of auxin transport and auxin signaling and treatment with far red light induces root coiling in the phospholipase-A mutant: ppla-1-f. Significance for surface penetration? *J. Plant Physiol.* **196–197**, 53–59.
- Pickett, F.B., Wilson, A.K. and Estelle, M. (1990) The aux1 mutation of Arabidopsis confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol.* **94**, 1462–1466.

- Rahman, A., Takahashi, M., Shibasaki, K., Wu, S., Inaba, T., Tsurumi, S. and Baskin, T.J. (2010) Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells. *Plant Cell*, **22**, 1762–1776.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J.J., Rothenberg, M. and Ecker, J.R. (1995) Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics*, **139**, 1393–1409.
- Ruiz-Herrera, L.F., Shane, M.W. and López-Bucio, J. (2015) Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **4**, 431–443.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santner, A.A. and Watson, J.C. (2006) The WAG1 and WAG2 protein kinases negatively regulate root waving in *Arabidopsis*. *Plant J.* **45**, 752–764.
- Singh, M., Gupta, A. and Laxmi, A. (2014) Glucose control of root growth direction in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* **65**, 2981–2993.
- Smith, S. and De Smet, I. (2012) Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**, 1441–1452.
- Stringlis, I.A., Proietti, S., Hickman, R., Van Verk, M.C., Zamioudis, C. and Pieterse, C.M.J. (2018) Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. *Plant J.* **93**, 166–180.
- Su, S.H., Gibbs, N.M., Jenczewicz, A.L. and Masson, P.H. (2017) Molecular mechanisms of root gravitropism. *Curr. Biol.* **27**, R964–R972.
- Swarup, R., Kramer, E.M., Perry, P., Knox, K., Leyser, H.M., Haseloff, J., Beemster, G.T., Bhalerao, R. and Bennett, M.J. (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat. Cell Biol.* **7**(11), 1057–1065.
- Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A. and Dufresne, A. (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* **206**, 1198–1206.
- Verbon, E.H. and Liberman, L.M. (2016) Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends Plant Sci.* **21**, 218–229.
- Weisburg, W.G., Barna, S.M., Palletier, D.A. and Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697–707.
- Zamioudis, C., Mastrorossi, P., Dhonukshe, P., Bihou, I. and Pieterse, C.M. (2013) Unravelling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiol.* **162**, 304–318.

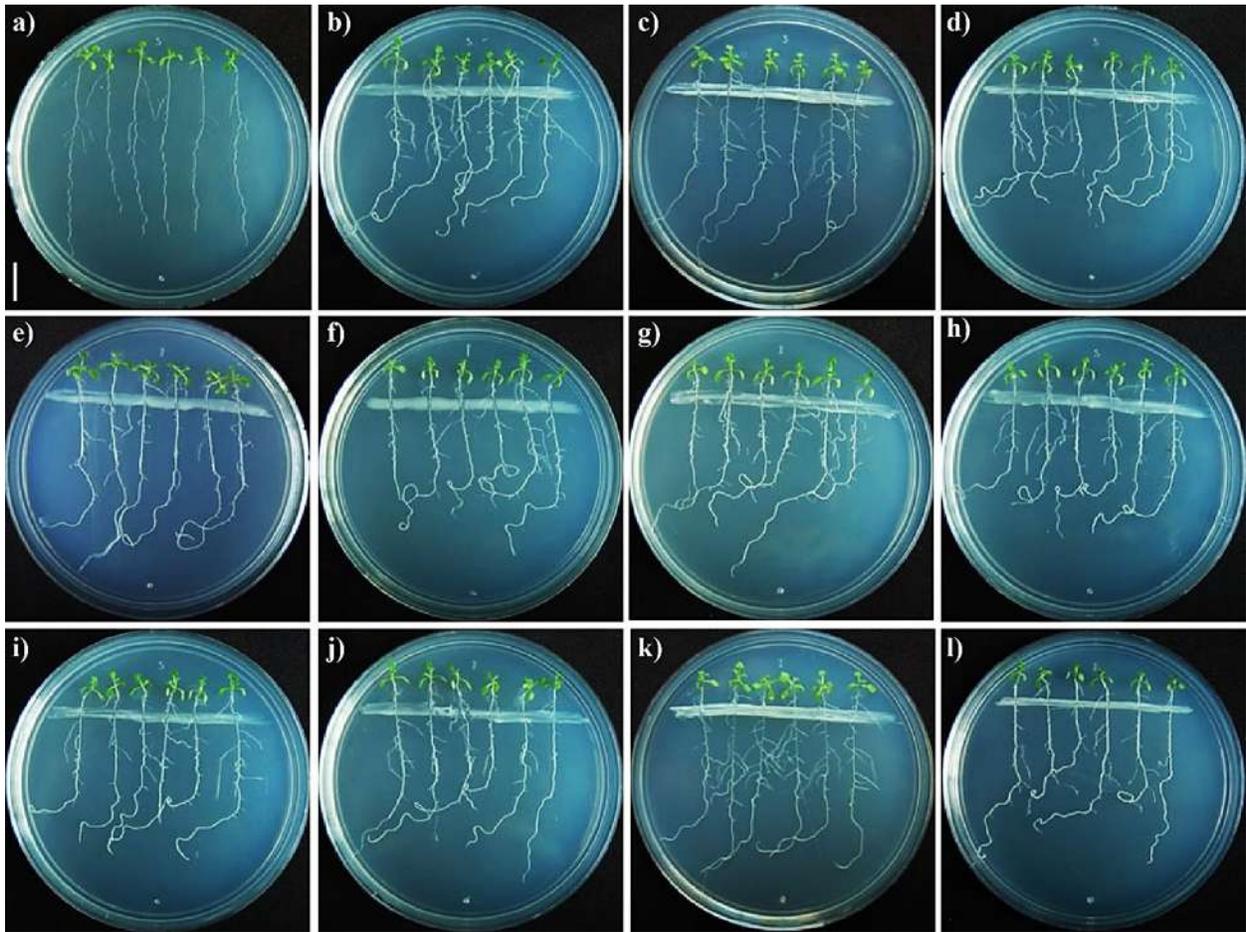


Figure S1. Phenotype of *Arabidopsis thaliana* seedlings co-inoculated with *Achromobacter* sp. 5B1.

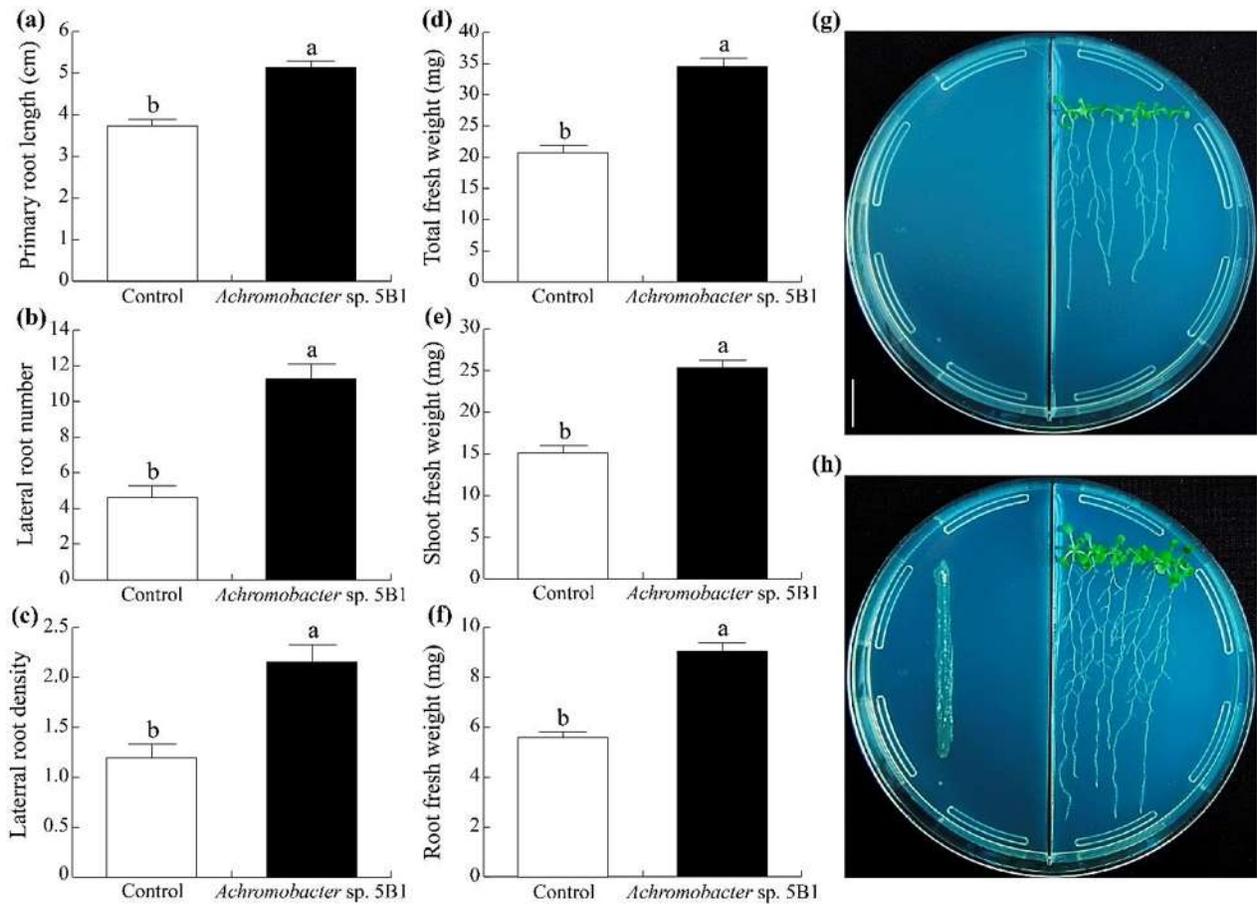


Figure S2. Effects of *Achromobacter* sp. 5B1 on growth and root architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown in divided Petri plates.

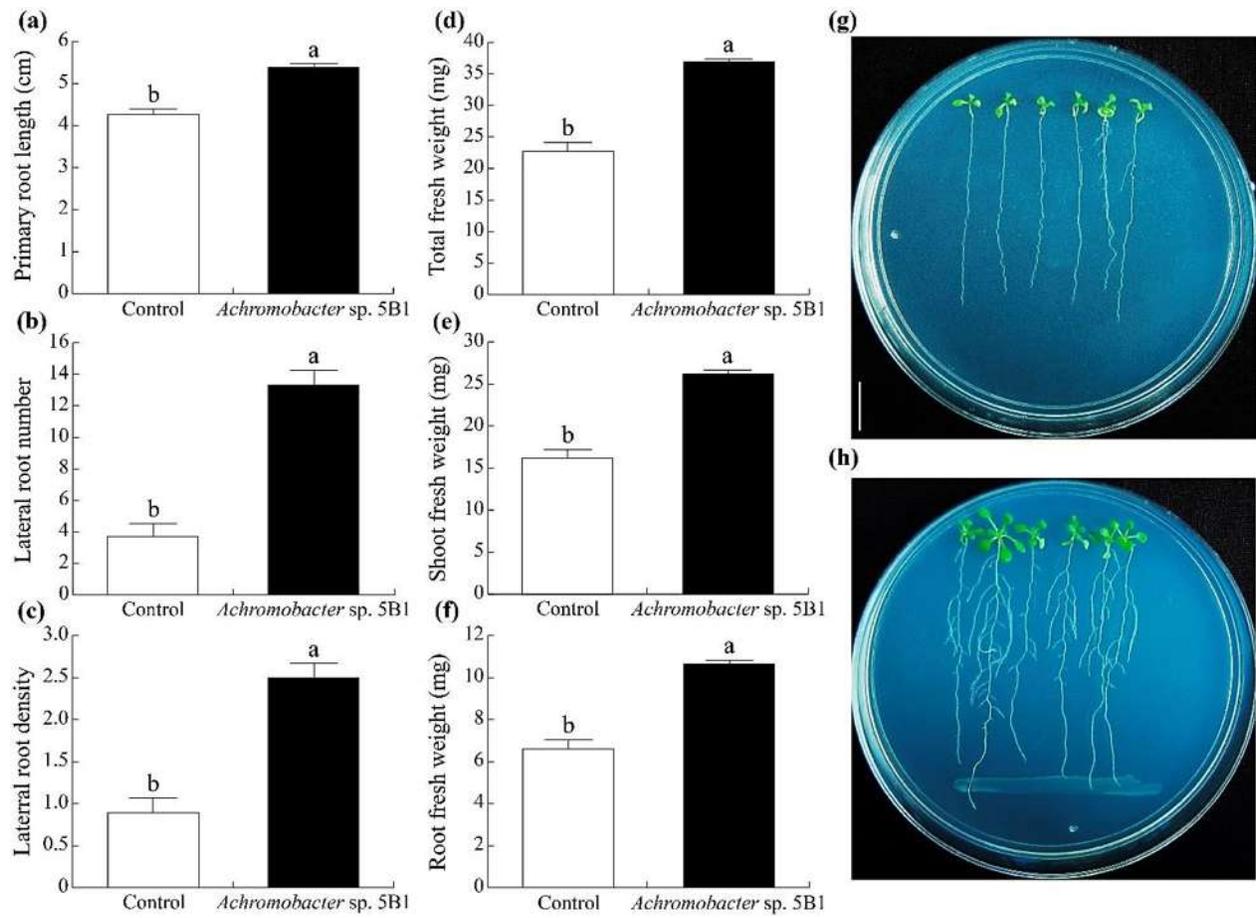


Figure S3. Influence of *Achromobacter* sp. 5B1 co-cultivated in the front of the primary root in growth and root system architecture.

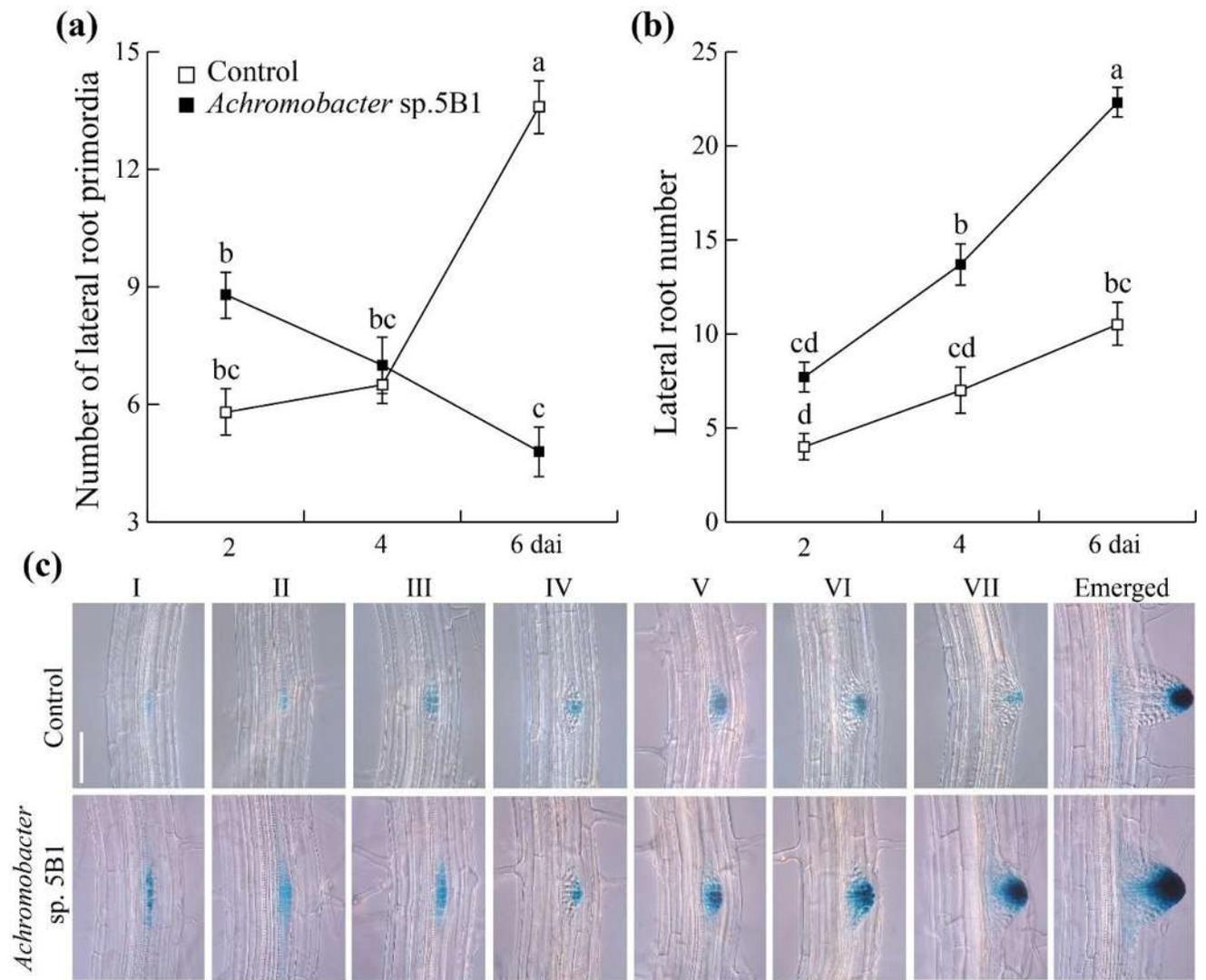


Figure S4. Development of the lateral root primordia (LRP) and lateral roots (RL) in *Arabidopsis* plants co-inoculated with *Achromobacter* sp. 5B1.

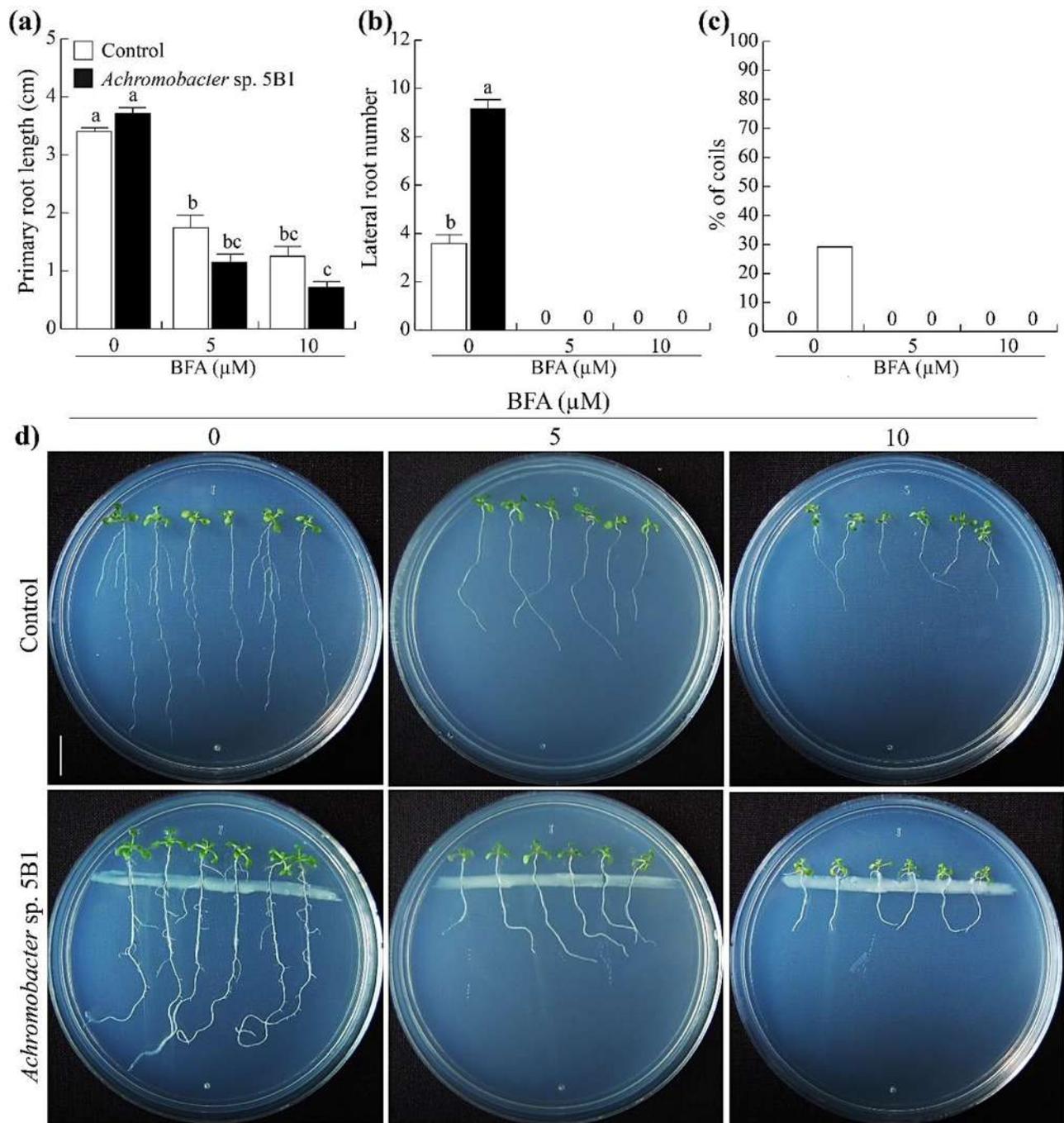


Figure S5. Effect of brefeldin A (BFA) on roots of *Arabidopsis thaliana* co-cultivated with *Achromobacter* sp. 5B1.

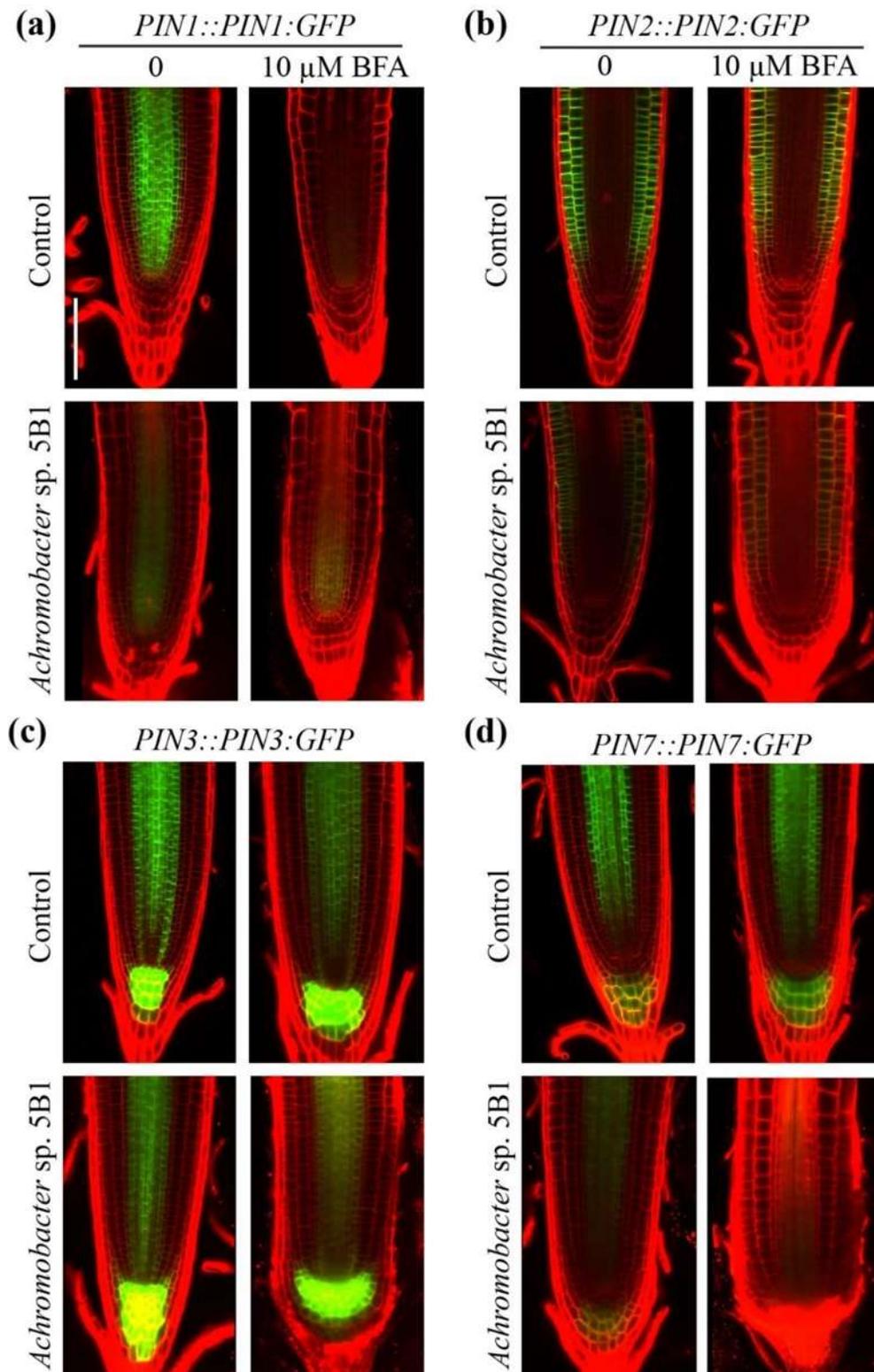


Figure S6. Expression pattern of PIN transporters in primary root tips of plants co-cultivated or not with *Achromobacter* sp. 5B1 and treated with brefeldin A.

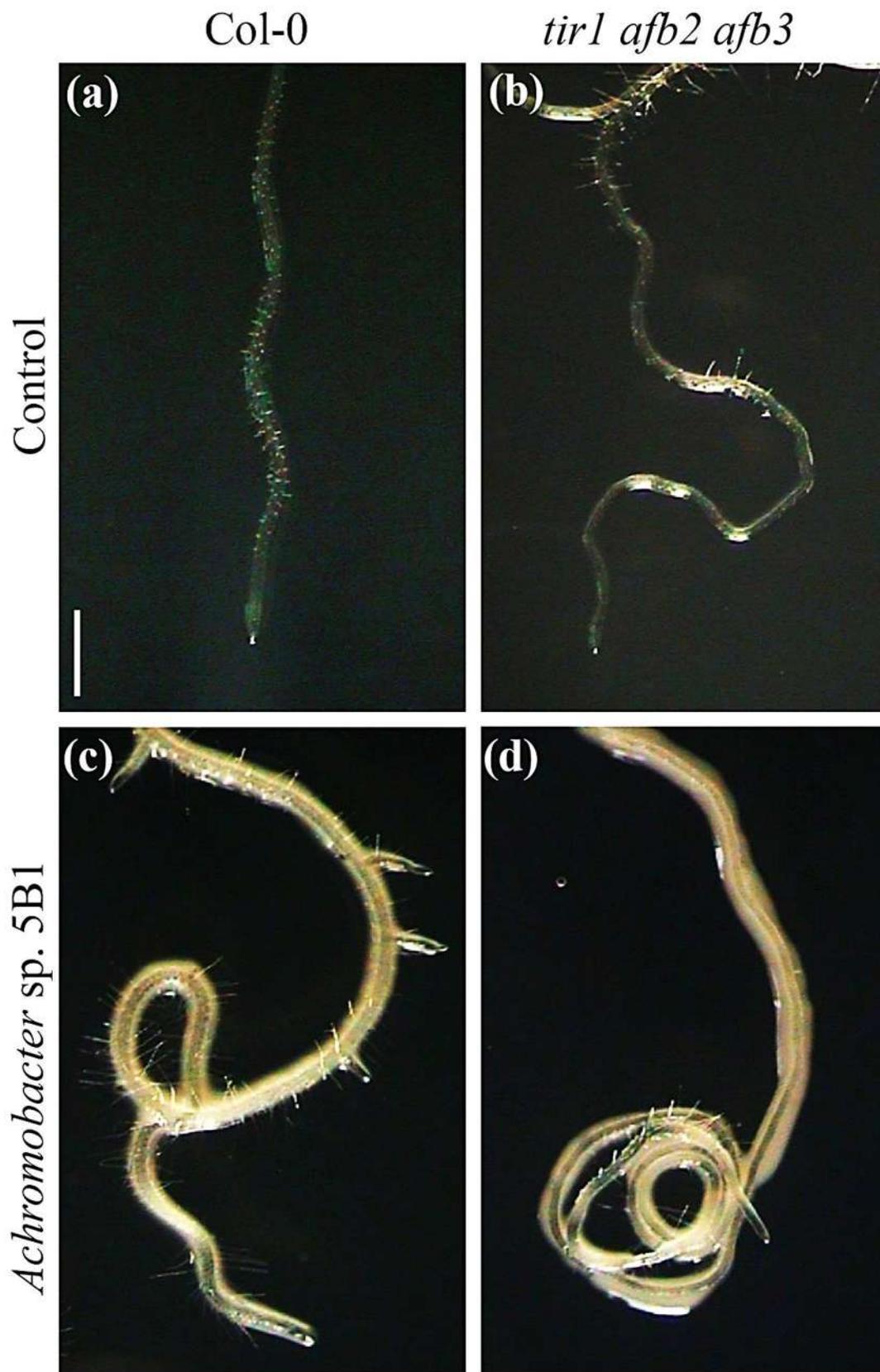


Figure S7. *Achromobacter* sp. 5B1 on growth of Arabidopsis WT and *tir1afb2afb3* primary roots.

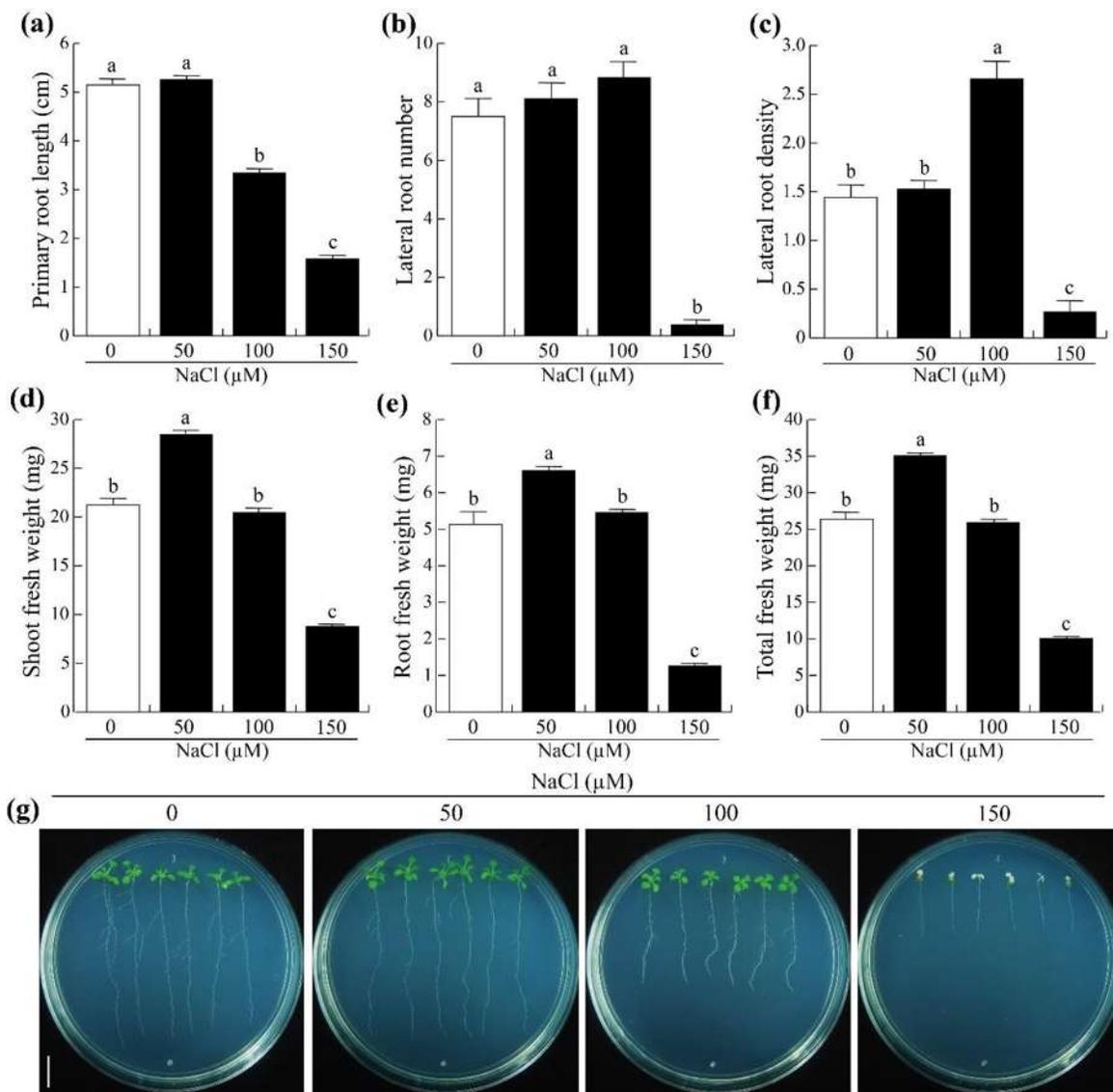


Figure S8. Effects of salt on root architecture and biomass production in *Arabidopsis thaliana* seedlings.

8.3. Capítulo III

RESEARCH HIGHLIGHT

Underground allies: how bacteria stimulate plant growth by altering root development

Leonie Verhage, *Research Highlights Editor*

Linked article: This is a Research Highlight about Jiménez-Vázquez *et al.* To view this article visit <https://doi.org/10.1111/tpj.14853>

In the middle of the Chihuahuan desert in Mexico, far from civilization, lies a natural sinkhole called the Poza-Salada. It is a very extreme environment, scarce in nutrients and water but high in salt. Despite this, several herbaceous plants and a few mesquite trees grow there healthily. This caught the attention of a group of researchers interested in plant–microbe interactions. It is becoming more and more apparent that the microbial composition of the soil plays a key role in plant health and resistance to stresses (Vandenkoornhuysse *et al.*, 2015), and the researchers were eager to investigate the bacterial community of the rhizosphere of these plants. They visited the site and collected soil samples from around one of the mesquite trees. In this issue of *The Plant Journal*, Kirán R. Jiménez-Vázquez and colleagues present their findings on one of the bacterial strains from this soil that was of particular interest.

The bacterium in question was identified and designated as *Achromobacter* sp. 5B1. It had caught their attention because *Arabidopsis* seedlings that were co-cultivated with the strain showed a twofold increase in total fresh weight. Upon closer inspection, it turned out that these bacteria had major effects on the root system. Compared to seedlings grown axenically on agar plates, plants that were placed over a bacterial streak had a higher lateral root density. The primary root was longer and deviated from the gravity vector, forming coils (see Figure). Furthermore, when grown on medium supplemented with salt, the plants inoculated with these bacteria still showed higher lateral root density and increased fresh weight compared to axenically grown plants. This indicates that the *Achromobacter* strain promotes plant health by altering root development, and has the potential to reduce the effect of salt stress.

Based on the agravitropic root phenotype, and given the intimate involvement of auxin in root architecture and gravitropism (Brand *et al.*, 2012), the authors investigated the possibility that these bacteria cause a change in auxin signaling. Gravity is sensed in the columella, a specialized gravity-sensing region at the tip of the root, and a gravity stimulus causes auxin transporters of the PIN-formed (PIN)

protein family to localize to the bottom side of the columella cells. This directs the auxin flow towards the lower side of the root, dictating its growth towards the gravity vector (Kleine-Vehn *et al.*, 2010). To visualize auxin distribution in roots grown with or without these bacteria, the authors made use of a reporter gene under the control of an auxin-responsive promoter (*DR5:GFP*). In the roots co-cultivated with *Achromobacter* sp. 5B1, they observed an increased auxin response in lateral root primordia. Moreover, they found a different, asymmetrical distribution in the root tip, with response maxima at the very end of the tip and the concave side of the root coil. To understand what is behind this different distribution, the authors studied the abundance of several PINs by measuring fluorescence intensity in transgenic seedlings expressing GFP-labeled constructs. They found that all the investigated PIN proteins showed altered abundance in roots co-cultivated with these bacteria (see Figure). Moreover, when they applied the auxin transport inhibitor Brefeldin A, which is known to alter PIN localization, the effect of these bacteria on the roots was disrupted. Hence, PIN proteins appear to play an important role in the bacterial-induced root alterations.

Further analysis of the underlying pathway showed that the response in the primary root might not be controlled by the exact same pathway as the response of lateral root growth. The most characterized mechanism by which plants sense auxin involves Aux/IAA co-receptors and AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs). ARFs are transcription factors that bind to specific promoter sequences in auxin-regulated genes. When auxin levels are low, Aux/IAA proteins bind to the ARFs and form a repressive complex. Upon auxin perception, Aux/IAs are targeted for degradation, releasing ARFs from the repressive complex and allowing them to regulate gene expression (Bargmann and Estelle, 2014). The authors investigated mutants defective in this mechanism, including mutants for several proteins involved in the degradation of Aux/IAA. They found that several of the mutants showed an altered primary root growth and coiling response, but only a minor effect on

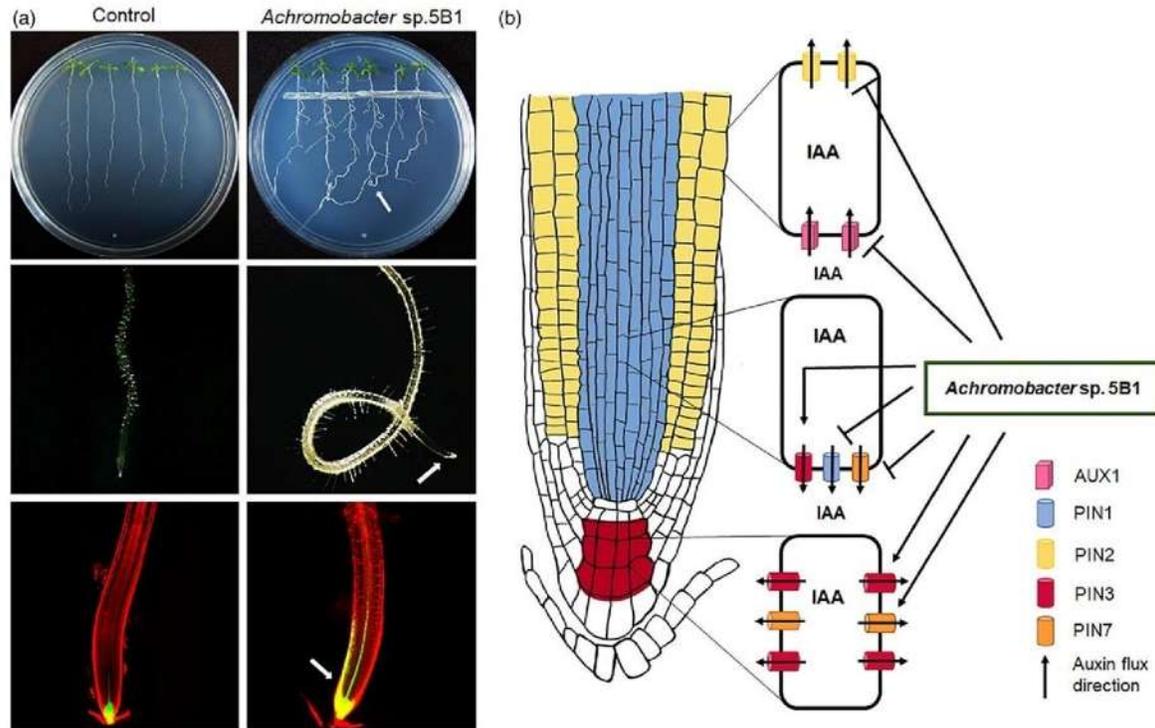


Figure. The effect of cultivating *Arabidopsis* seedlings with *Achromobacter* sp. 5B1. (a) Seedlings grown with and without *Achromobacter* sp. 5B1. From top to bottom, *Arabidopsis* seedlings, a close-up of the primary root, and confocal imaging of *DR5:GFP* expression in the primary root tip. The arrows show the formation of a coil, the tip of the root after coil formation, and the redistribution of the auxin response towards the concave side of the root, respectively. (b) Cartoon of the primary root tip of *Arabidopsis* seedlings showing the expression domains of all major PIN transporters in different colors. *Achromobacter* sp. 5B1 promotes PIN3 expression in columella cells while repressing PIN1 and PIN2 in meristem and cell elongation regions. Figure by Kirán R. Jiménez-Vázquez.

the increase of lateral roots was observed. The same was true for mutants for auxin transporters, where only the root coiling response was affected. Hence, it seems that root coiling and primary and lateral root growth are not orchestrated by a single mechanism.

The paper adds to an increasing body of research that indicates that in their natural environment, plant roots are greatly affected by the microbial communities. Natural soil conditions are of course rather different from the sterile agar plates used for studying root growth in laboratories. However, corresponding author José López-Bucio is not worried that findings on root behavior based on these artificial growth conditions are not representative of natural conditions. With his experience in the reaction of roots to nutrient availability on plates and in the field, he believes that root growth in axenic and natural conditions is comparable enough to draw conclusions. Moreover, plants grown on soil or rock wool in growth chambers will attract bacteria and other microbes by releasing nutritive compounds by

their roots just like in the field. So, there is no need to suddenly change the way root growth experiments are performed. Although most researchers would probably be happy to go on a field trip to a natural site like the Poza-Salada.

REFERENCES

- Bargmann, B.O.R. and Estelle, M. (2014) Auxin perception: in the IAA of the beholder. *Physiol. Plant.* **151**, 52–61.
- Brand, L.R., Wells, D.M., Larrieu, A. et al. (2012) Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, 4668–4673.
- Jiménez-Vázquez, K.R., García-Cárdenas, E., Barrera-Ortiz, S., Ortiz-Castro, R., Ruiz-Herrera, L.F., Ramos-Acosta, B.P., Coria-Arellano, J.L., Saenz-Mata, J. and López-Bucio, J. (2020) The plant beneficial rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1 influences root development through auxin signaling and redistribution. *Plant J.* **103**(5), 1639–1654.
- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A.R., Tasaka, M., Morita, M.T. and Friml, J. (2010) Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 22344–22349.
- Vandenkoornhuysse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A. and Dufresne, A. (2015) The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.* **206**, 1196–1206.

9. DISCUSIÓN

Las rizobacterias contribuyen en el crecimiento y la productividad de los cultivos sin afectar la fertilidad de los suelos, particularmente las especies de bacterias aisladas a partir de ambientes extremos exhiben efectos promisorios en cultivos en condiciones adversas. Sin embargo, antes de la formulación de bioinoculantes, es necesario entender los procesos que ocurren durante la interacción planta-bacteria, como los cambios en el crecimiento de los órganos y los mecanismos moleculares implicados en la interacción. Hasta ahora, la mayoría de las rizobacterias reportadas inhiben el crecimiento de la raíz primaria y promueven la formación de raíces laterales a través de alteraciones en las respuestas hormonales, lo que incrementa su capacidad de exploración y adquisición de nutrientes (Lopez-Bucio *et al.*, 2007, Sukumar *et al.*, 2013; Spaepen *et al.*, 2014).

En el presente trabajo se caracterizó el efecto de *Achromobacter* sp. 5B1 en el crecimiento y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* bajo diferentes condiciones de crecimiento: *in vitro* y en suelo. Sorpresivamente, la acumulación de biomasa en la planta correlacionó con los movimientos gráciles de la raíz causados por la redistribución de auxinas. Hasta donde sabemos, este trabajo es el primer reporte de una especie del género *Achromobacter* con propiedades bioestimulantes en el desarrollo de la raíz. Anteriormente se había descrito en este microorganismo otras propiedades como la fijación de nitrógeno, solubilización de fósforo y producción de auxinas para este género, por lo que se abren posibles aplicaciones en la agricultura (Bertrand *et al.*, 2000; Jha y Kumar, 2009).

Achromobacter sp. 5B1 tiene la capacidad de promover el crecimiento mediante cambios en el comportamiento de la raíz que podrían contribuir en una mayor exploración del suelo hacia zonas ricas en nutrientes. Los compuestos orgánicos volátiles y los compuestos difusibles producidos por la cepa *Achromobacter* sp. 5B1 tienen efectos promotores en *Arabidopsis thaliana*, sin embargo, la colonización de la raíz desvía el crecimiento de dicho órgano del vector de gravedad, lo que resulta en la formación de giros que mejoran la formación de raíces laterales al acelerar el desarrollo de los primordios. Además, los efectos probióticos se mantienen en el crecimiento de las plantas en suelo y se reflejan por el aumento en la producción de biomasa foliar, radicular y la producción de silicuas.

La formación de gradientes de auxinas depende de la distribución y actividad de los transportadores PIN (Blilou *et al.*, 2005; Band *et al.*, 2014). El análisis de la expresión de dichos transportadores muestra la represión de PIN1 y PIN7 en la provascularura, así como de PIN2 en las células del córtex y la epidermis, mientras que PIN3 (indispensable en la distribución asimétrica de las auxinas en la cofia de la raíz) no presenta cambios en la provascularura e incrementa la expresión en la columnela de las raíces que forman giros como resultado de la colonización con *Achromobacter* sp. 5B1, sugiriendo que la formación de giros es resultado de la alteración del transporte de auxinas en la punta de la raíz.

La BFA es un compuesto que inhibe el tráfico vesicular, impidiendo la localización de las proteínas en la membrana plasmática, donde llevan a cabo su función. En reportes previos, el uso de BFA es por tiempos limitados y posteriormente se recupera el tráfico vesicular, sin embargo, en este trabajo se mantuvieron las plantas con BFA durante 6 días, lo que resulta en el bloqueo tanto de la distribución asimétrica de auxinas como en la formación de giros en las raíces en contacto con *Achromobacter* sp. 5B1. La expresión de las proteínas PIN también se altera bajo los tratamientos con BFA, PIN1 muestra la represión más severa y dicho efecto se mantiene con la inoculación con *Achromobacter* sp. 5B1. Aunque el resto de las proteínas analizadas no presentan una represión marcada con el tratamiento por sí mismo con BFA, el co-cultivo con la bacteria y la BFA revela una represión drástica, incluso la interrupción del transporte de auxinas provoca la muerte de las células de la columnela. Para que ocurra el cambio en la dirección del crecimiento y formación de los giros se requiere la localización de las proteínas PIN en la membrana plasmática, así que *Achromobacter* sp. 5B1 podría estar actuando principalmente a nivel de expresión de los transportadores de auxinas de manera específica, aunque no podemos descartar la posibilidad de que afecte la localización los transportadores de auxinas.

Los comportamientos agravitrópicos en la raíz son característicos de plantas mutantes afectadas en el transporte y la señalización de auxinas (Swarup *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 1998; Dharmasiri *et al.*, 2005b). En las mutantes *eir1-1* y *aux1-7* afectadas en el transportador de salida de auxinas PIN2 y en el importador de auxinas AUX1 respectivamente, se interrumpe la respuesta gravitrópica e incluso se forman giros de la

misma manera que en las plantas tratadas con *Achromobacter* sp.5B1. Sin embargo, la formación de raíces se inhibe, aunque en cierto grado *Achromobacter* sp. 5B1 reestablece la formación de estas estructuras. Adicionalmente, y de manera sincronizada, prácticamente todas las raíces de las mutantes afectadas en los transportadores mencionados, presentan giros en un mismo sentido, fenómeno que también ocurre en las mutantes afectadas en la señalización de auxinas *axr1-3* y *tir1afb2afb3*. Lo anterior confirma que *Achromobacter* sp.5B1 afecta el transporte y la señalización de auxinas en cierto grado y de manera específica en la punta de la raíz e intensifica la respuesta auxínica en la zona de diferenciación de la raíz.

10. CONCLUSIÓN

Achromobacter sp. 5B1 es el primer probiótico identificado que modifica la dirección del crecimiento de la raíz a través de la alteración específica en el transporte y distribución de las auxinas en la raíz e induce la respuesta auxínica mejorando la formación de raíces laterales.

11. REFERENCIAS

- Adamowski, M. y Friml, J.** (2015) PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *The Plant Cell*. 27, 20–32.
- Ahemad, M y Kibret, M.** (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University - Science*. 26, 1–20.
- Alvin, A. Miller, K.I. Neilan, B.A.** (2014) Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research*. 169, 483–495.
- Ambudkar, S.V., Kim, I.W., Sauna, Z.E.** (2006) The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 27, 392–400.
- Armegot, L., Marques-Bueno, M.M., Jaillais, Y.** (2016) Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases. *Journal Experimental Botany*. 67, 4015-4037.
- Arora, N.K., Tewari, S., Singh, S., Lal, N., Maheshwari, D.K.** (2012) PGPR for protection of plant health under saline conditions. In: *Maheshwari D. (eds) Bacteria in Agrobiolgy: Stress Management*. Springer, Berlin, Heidelberg. 239-258.
- Atkinson, JA., Rasmussen, A., Traini, R., Voß, U., Sturrock, C., Mooney, SJ., Wells, DM., Bennett, M.J.** (2014) Branching out in roots: uncovering form, function, and regulation. *Plant Physiology*. 166, 538-550.
- Backer, R.J., Rokem, S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., Smith, D.L.** (2018) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science*. 9, 1473.
- Bailly, A., Sovero, V., Geisler, M.** (2006) The Twisted Dwarf's ABC: how immunophilins regulate auxin transport. *Plant and Signaling Behavior*. 1, 277–280.
- Bailly A, Sovero V, Vincenzetti V, Santelia, D., Bartnik, D., Koenig, B.W., Mancuso, S., Martinoia, E., Geisler, M.** (2008). Modulation of Pglycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *Journal of Biological Chemistry*. 283, 21817–21826.
- Baldwin, K.L., Strohm, A.K., Masson, P.H.** (2013) Gravity sensing and signal transduction in vascular plant primary roots. *American Journal of Botany*. 100, 126–142.
- Band, L.R., Wells, D.M., Fozard, J.A., Ghetiu, T., French, A.P., Pound, M.P., Wilson, M.H., Yu, L., Li, W., Hijazi, H.I., Oh, J., Pearce, S.P., Perez-Amador, M.A., Yun, J., Kramer, E., Alonso, J.M., Godin, C., Vernoux, T., Hodgman, T.H., Pridmore, T.P., Swarup, R., King, J.R., Bennett, M.J.** (2014) Systems analysis of auxin transport in the Arabidopsis root apex. *The Plant Cell*. 26, 862–875.
- Barbosa, I.C., Zourelidou, M., Willige, B.C., Weller, B., Schwechheimer, C.** (2014) D6 PROTEIN KINASE activates auxin transport-dependent growth and PIN-FORMED phosphorylation at the plasma membrane. *Developmental Cell*. 29, 674–685.
- Barbosa, I.C.R., Hammes, U.Z., Schwechheimer, C.** (2018) Activation and polarity control of PIN-FORMED auxin transporters by phosphorylation. *Trends in Plant Science*. 23, 523-538.
- Bhattacharyya, P.N. y Jha, D.K.** (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 28, 1327-1350.

- Bender, J. y Celenza, J.L.** (2009) Indolic glucosinolates at the crossroads of tryptophan metabolism. *Phytochemistry Reviews*. 8, 25–37.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertova, D., J€urgens, G., Friml, J.** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*. 115, 591–602.
- Bennett, S.R.M., Alvarez, J., Bossinger, G., Smyth, D.R.** (1995) Morphogenesis in *pinoid* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 8, 505–520.
- Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A, Amanda, R., Burkhard, W., Schulz, B., Feldmann, W.A.** (1996) *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*. 273, 948–950.
- Bennett TA, Liu, M.M., Aoyama, T., Bierfreund, N.M., Braun, M., Coudert, Y., Dennis, R.S., O’Connor, D., Wang, X.Y., White, C.D.** (2014) Plasma membrane-targeted PIN proteins drive shoot development in a moss. *Current Biology*. 24, 2776–2785.
- Bennett, T.A.** (2015) PIN proteins and the evolution of plant development. *Trends in Plant Science*. xx: 1–10.
- Berckmans, B., Vassileva, V., Schmid, S.P.C., Maes, S., Parizot, B., Naramoto, S., Magyar, Z., Kamei C.L.A., Koncz, C., Bogre, L., Persiau, G., De Jaeger G., Jiří Friml, J. Simon, R., Beeckman, T., De Veylde, L.** (2011) Auxin-dependent cell cycle reactivation through transcriptional regulation of *Arabidopsis* E2Fa by lateral organ boundary proteins. *Plant Cell*. 23, 3671–3683.
- Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P., Cleyet-Marel, J.C.** (2000) Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Canadian Journal of Microbiology*. 46(3), 229-236.
- Brumos, J., Robles, L.M., Yun, J., Vu, T.C., Jackson, S., Alonso, J.M., Stepanova, N.N.** (2018) Local auxin biosynthesis is a key regulator of plant development. *Developmental Cell*. 47:1-13.
- Bulgarelli, D., Schlaeppli, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L., Schulze-Lefert, P.** (2013) Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*. 64:807-838.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R.** (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*. 13: 843-852.
- Contesto, C., Milesi, S., Mantelin, S., Zancarini, A., Desbrosses, G., Varoquaux, F., Bellini, C., Kowalczyk, M., Touraine, B.** (2010) The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta*. 232: 1455-1470.
- Costacurta, A., Keijers, V., Vanderleyden, J.** (1994) Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Molecular & General Genetics*. 243: 463-472.
- Czaja, A., Estrada-Rodríguez, J.L., Flores-Olvera, H.** (2014) The gypsum dunes of Cuatrociénegas valley, Mexico, a secondary ecosystem with Gypsophytes. In: Ajmal Khan M, Böer B, Öztürk M, Al Abdessalaam TZ, Clüsener-Godt M, Gul B (eds) Cash crop halophyte and biodiversity conservation, vol 4. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, pp 81–92.

- Friml, J., Wísniowska, J., Benková, E., Mendgen, K., Palme, K.** (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*. 415, 806–809.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa R., Jürgens.** (2003) G. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*. 426, 147–153.
- Friml, J.** (2010) Subcellular trafficking of PIN auxin efflux carriers in auxin transport. *European Journal of Cell Biology*. 89, 231–235.
- Galvan-Ampudia CS, Julkowska MM, Darwish E, Gandullo J, Korver RA, Brunoud G, Haring, M.A., Munnik, T., Vernoux, T., Testerink, C.** (2013) Halotropism is a Response of plant roots to avoid a saline environment. *Current Biology*. 23(20), 2044–2050.
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., Palme, K.** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*. 282, 2226–2230.
- Ganguly, A., Park, M., Kesawat, M.S., Cho, H.T.** (2014) Functional analysis of the hydrophilic loop in intracellular trafficking of *Arabidopsis* PIN-FORMED proteins. *Plant Cell*. 26, 1570–1585.
- Garay-Arroyo, A., De La Paz, S.M., García-Ponce, B., Azpeitia, E., Alvarez-Buylla, E.R.** (2012) Hormone symphony during root growth and development. *Developmental Dynamics*. 241, 1867–1885.
- Garbers, C., DeLong, A., Deruere, J., Bernasconi, P., Soll, D.** (1996) A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*. 15, 2115–2124.
- Geisler, M., Kolukisaoglu, H.U., Bouchard, R., Billion, K., Berger, J., Saal, B., Frangne, N., Koncz-Kálmán, Z., Koncz, Csaba., Dudler, R., Blakeslee, J.J., Murphy, A.S., Martinoia, E., Schulz B.** (2003) TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin like protein, interacts with *Arabidopsis* multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Molecular Biology of the Cell*. 14, 4238-49.
- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., Ejendal, K.F.K., Smith, A.P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Müller, A., Hrycyna, C.A., Dudler, R., Murphy, A.S., Martinoia, E.** (2005) Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *The Plant Journal*. 44:,179–194.
- Geisler, M. y Murphy, A.S.** (2006) The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters*. 580, 1094–1102.
- Geisler, M., Aryal, B., di Donato, M. Hao, P.** (2017) A critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. *Plant Cell Physiology*. 58, 1601-1614.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jurgens, G., Palme, K.** (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*. 413, 425-428.
- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Muller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., Jurgens, G.** (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*. 112, 219-230.
- Glick, B.R.** (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 169, 30–39.
- Goldsmith, M.H.** (1977) The polar transport of auxin. *Annual Review of Plant Physiology*. 28, 439–478.

- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.S., Patra, J.K.** (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*. 206, 131–140.
- Goyal, A., Szarzynska, B., Fankhauser, C.** (2013) Phototropism: at the crossroads of light-signaling pathways. *Trends in Plant Science*. 18(7), 393–401.
- Grones, P. y Friml, J.** (2015) Auxin transporters and binding proteins at a glance. *Journal of Cell Science*. 128, 1–7.
- Gupta, G., Parihar, S. S., Ahirwar, N. K., Snehi, S. K., Singh, V.** (2015) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal Microbial Biochemical. Technology*. 7, 096–102.
- Harmer, S.L. y Brooks, C.J.** (2018) Growth-mediated plant movements: hidden in plain sight. *Current Opinion in Plant Biology*. 41, 89–94.
- Jha, P. y Kumar, A.** (2009) Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microbial Ecology*. 58, 179–188.
- Jha, C.K. y Saraf, M.** (2015) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *Journal of Agricultural Research and Development*. 5, 108–119.
- Jenness, M.K., Carraro, N., Pritchard, C.A., Murphy, A.S. (2019)** The Arabidopsis ATP-BINDING CASSETTE Transporter ABCB21 Regulates Auxin Levels in Cotyledons, the Root Pericycle, and Leaves. *Frontiers in Plant Science*. 10, 806.
- Kamimoto, Y., Terasaka, K., Hamamoto, M., Takanashi, K., Fukuda, S., Shitan, N., Akifumi Sugiyama, A., Suzuki, H., Shibata, D., Wang, B., Pollmann, S., Geisler, M., Yazaki, K.** (2012) Arabidopsis ABCB21 is a facultative auxin importer/ exporter regulated by cytoplasmic auxin concentration. *Plant Cell Physiology*. 53, 2090–2100.
- Kang, B.G., Kim, W.T., Yun, H.S., Chang, S.C.** (2010) Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. *Plant Biotechnology Reports*. 4, 179–183.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Swarup, R., Bennett, M., Friml, J.** (2006) Subcellular trafficking of the Arabidopsis auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell*. 18, 3171–3181.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, Met.** (2008a) ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. *Current Opinion in Plant Biology*. 18, 526–531.
- Kleine-Vehn, J., Huang, F., Naramoto, S., Zhang, J., Michniewicz, M., Offringa, R., Friml, J.** (2009) PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-independent trafficking in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 21, 3839–3849.
- Kleine-Vehn, J., Ding, Z., Jones, A.R., Tasaka, M., Morita, M.T., Friml, J.** (2010) Gravity-induced PIN transcytosis for polarization of auxin fluxes in gravity-sensing root cells. *PNAS*. 107(51), 22344–22349.
- Kleine-Vehn, J., Wabnik, K., Martiniere, A., Langowski, L., Willig, K., Naramoto, S., Leitner, J., Tanaka, H., Jakobs, S., Robert, S.** (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Molecular Systems Biology*. 7, 540.
- Kim, J., Lee, H.W.** (2013) Direct activation of *EXPANSIN14* by LBD18 in the gene regulatory network of lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*. 8, e22979.

- Kimura, T., Haga, K., Shimizu-Mitao, Y., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Hayashi, K., Kakimoto, T., Sakai T.** (2018) Asymmetric auxin distribution is not required to establish root phototropism in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*. 59(4), 828–840.
- Klíma, P., Laňková, M., Zažímalová, E.** (2016) Inhibitors of plant hormone transport. *Protoplasma*. 253, 1391–1404.
- Kiss, J.Z., Wright, J.B., Caspar, T.** (1996) Gravitropism in roots of intermediate-starch mutants of *Arabidopsis*. *Physiology Plant*. 97, 237–244.
- Kong, Y., Zhu, Y., Gao, C., She, W., Lin, W., Chen, Y., Han, N., Bian, H., Zhu, M., Wang, J.** (2013) Tissue-specific expression of SMALL AUXIN UP RNA41 differentially regulates cell expansion and root meristem patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*. 54, 609-621.
- Kumar, A., Kumar, R., Kumari, M., Goldar, S.** (2020) Enhancement of Plant Growth by Using PGPR for a Sustainable Agriculture: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 9(2), 152-165.
- Laskowski, M., Grieneisen, V.A., Hofhuis, H., Hove, C.A.T., Hogeweg, P., Marée, A.F.M., Scheres, B.** (2008). Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biology*. 6, e307.
- Lee, H.J., Ha, J.H., Kim, S.G., Choi, H.K., Kim, Z.H., Han, Y.J., Kim, J.I., Oh, Y., Fragoso, Y., Shin, K., Hyeon, T., H.G., Choi, Oh, K.H., Baldwin, I.T., Park C.M.** (2016) Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in *Arabidopsis thaliana* roots. *Science Signaling*. 9, ra106–ra106.
- Lee, H.J., Kim, H.S., Park, J.M., Cho, H.S., Jeon, J.H.** (2020) PIN-mediated polar auxin transport facilitates root-obstacle avoidance. *New Phytologist*. 225, 1285–1296.
- Leyser, O.** (2018) Auxin signaling. *Plant Physiology*. 176, 465-479.
- Liscum, E., Askinosie, S.K., Leuchtman, D.L., Morrow, J., Willenburg, K.T, Coats, D.R.** (2014) Phototropism: growing towards an Understanding of plant movement. *Plant Cell*. 26(1), 38–55.
- Liu, J., M.S., Chen, C., Lindsey, K.** (2017). Crosstalk Complexities between Auxin, Cytokinin and Ethylene in *Arabidopsis* Root Development: From Experiments to Systems Modeling and Back Again. *Molecular Plant*. 10, 1480–1496.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., Sandberg, G.** (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*. 2005. 17, 1090–1104.
- Loper, JE., Gross, H.** (2007) Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *European Journal of Plant Pathology*. 119, 265-278.
- López-Bucio, J., Campos-Cuevas, J.C., Hernandez-Calderon, E., Velasquez- Becerra, C., Farias-Rodriguez, R., Macias-Rodriguez, L.I., Valencia-Cantero, E.** (2007) *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter rootsystem architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20, 207-217.
- Ma, Y., Oliveira, R.S., Wu, L., Luo, Y., Rajkumar, M., Rocha, I., Freitas, H.** (2015) Inoculation with metal-mobilizing plant-growth-promoting rhizobacterium *Bacillus* sp. SC2b and its role in rhizoremediation. *Journal Toxicology Environmental*. 78, 931–944.
- Maeda, H. y Dudareva, N.** (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 63, 73–105.

- Maher, E.P. y Martindale, S.J.** (1980) Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered responses to auxins and gravity. *Biochemical Genetics*. 18, 1041–1053.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P.J., Bennett, M., Sandberg, G.** (2002) AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell*. 14, 589–597.
- Marhaý, P., Vanstraelen, M., De Rybel, B., Zhaojun, D., Bennett, M.J., Beeckman, T., Benková, E.** (2013) Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *EMBO Journal*. 32, 149–158.
- Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsumeb, M., Hanadaa, A., Yaenoo, T., Shirasua, K., Yaod, H., McSteend, P., Yunde, Zhaoe, Hayashif, K., Kamiyaa, Y., Kasaharaa, H.** (2011) The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *PNAS*. 108,18512–17.
- Massa, G.D. y Gilroy, S.** (2003) Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 33(3), 435–445.
- Meroz, Y., Bastien, R., Mahadevan, L.** (2019) Spatio-temporal integration in plant tropisms. *The Royal Society*. 16, 20190038.
- Miyazawa, Y., Ito, Y., Moriwaki, T., Kobayashi, A., Fujii, N., Takahashi, H.** (2009) A molecular mechanism unique to hydrotropism in roots. *Plant Science*. 177(4), 297–301.
- Monshausen, G.B., Miller, N.D., Murphy, A.S., Gilroy, S.** (2011) Dynamics of auxin-dependent Ca²⁺ and pH signaling in root growth revealed by integrating high-resolution imaging with automated computer vision-based analysis: Calcium and auxin signaling. *Plant Journal*. 65(2), 309–318.
- Moreno-Risueno, MA., Van Norman, J.M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S.E., Benfey, P.N.** (2010) Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science*. 329, 1306–1311.
- Morita, M.T.** (2010) Directional gravity sensing in gravitropism. *Annual Review of Plant Biology*. 61, 705-720.
- Motte, H., Vanneste, S., Beeckman, T.** (2019) Molecular and environmental regulation of root development. *Annual Review of Plant Biology*. 70, 465-88.
- Müller, A., Guan, C., Gälweiler, L., Tänzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., Palme, K.** (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO Journal*. 17, 6903–6911.
- Murphy, AS., Hoogner, K.R., Peer, WA., Taiz, L.** (2002) Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane-associated aminopeptidases from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 128, 935–950.
- Muthert, L.W.F., Izzo, GL., Zanten, M.V.** (2020) Root Tropisms: Investigations on Earth and in Space to Unravel Plant Growth Direction. *Frontiers in Plant Science*. 10, 1807.
- Mravec J, Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Křeček, P., Bielach, A., Petrášek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y.D., Dobrev, P., Schwarzerová, K., Rolčík, J., Seifertová, D., Luschnig, C., Benková, E., Zažímalová, E., Geisler, M., Friml, J.** (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*. 459, 1136–1140.

- Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C.J., Glawischnig, E., Olsen, C.E., Halkier, B.A., Glazebrook, J.** (2007) Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell*. 19, 2039–2052.
- Nakamura, M., Nishimura, T., Morita, M.T.** (2019) Bridging the gap between amyloplasts and directional auxin transport in plant gravitropism. *Current Opinion in Plant Biology*. 52, 54–60.
- Naramoto, S., Nodzynski, T., Dainobu, T., Takatsuka, H., Okada, T., Friml, J., Fukuda, H.** (2014) VAN4 encodes a putative TRS120 that is required for normal cell growth and vein development in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*. 55, 750-763.
- Naramoto, S.** (2017) Polar transport in plants mediated by membrane transporters: focus on mechanisms of polar auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*. 40, 8-14.
- Noh, B., Bandyopadhyay, A., Peer, W.A., Spalding, E.P., Murphy, A.S. (2003)** Enhanced gravi and phototropism in plant *mdr* mutant mis localizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature*. 423, 999–1002.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., Shimura, Y.** (1991) Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *Plant Cell*. 3, 677–684.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., Tasaka, M.** (2007) ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 19, 118–130.
- Olatunji, D., Geelen, D., Inge, Verstraeten.** (2017) Control of Endogenous Auxin Levels in Plant Root Development. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 2587.
- Ortiz-Castro, R., Diaz-Perez, C., Martinez-Trujillo, M., del Rio, R.E., Campos- Garcia, J., Lopez-Bucio, J.** (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *PNAS*. 108, 7253-7258.
- Overvoorde, P., Fukaki, H., Beeckman, T.** (2010) Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2, a001537.
- Palacio-Rodríguez, R., Coria-Arellano, J. L., López-Bucio, J., Sánchez-Salas, J., Muro-Pérez, G., 1012 Castañeda-Gaytán, G., and Sáenz-Mata, J.** (2017) Halophilic rhizobacteria from *Distichlis spicata* promote growth and improve salt tolerance in heterologous plant hosts. *Symbiosis*. 73(3), 179-189.
- Park, J.E., Park, J.Y., Kim, Y.S., Sraswick, P.E., Jeon, J., Yun, J., Kim, S.Y., Kim, J., Lee, Y.H., Park, C.M.** (2007b) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. 282, 10036-10046.
- Parry, G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C., Bennett, M.J.** (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant Journal*. 25, 399–406.
- Patten, C.L. y Glick, B.R.** (2002) Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Canadian Journal of Microbiology*. 48, 635–42.
- Péret, B., Swarup, K., Ferguson, A., Seth, M., Yang, Y., dhondt, S., James, N., Ilda Casimiro, I., Paula Perry, P., Adnan Syed, A., Haibing Yang, H., Jessica Reemmer, J., Edward Venison, E., Caroline Howells, C., Perez-Amador, M.A., Yun, Alonso, J., Beemster, G.T.S., Laplaze, L., Murphy, A., M.J., E., R.** (2012) AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell*. 24, 2874 – 2885.

- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S.C.** (2012) Hormonal modulation of plant immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 28, 489-521.
- Pollmann, S., Neu, D., Weiler, E.W.** (2003) Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry*. 62, 293–300.
- Postma, J.A. y Lynch, J.P.** (2011) Root cortical aerenchyma enhances the growth of maize on soils with suboptimal availability of nitrogen, phosphorus, and potassium. *Plant Physiology*. 156, 1190–1201.
- Qiu, T., Chen, Y., Li, M., Kong, Y., Zhu, Y., Han, N., Bian, H., Zhu, M., Wang, J.** (2013) The tissue-specific and developmentally regulated expression patterns of the SAUR41 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes: potential implications. *Plant Signaling and Behavior*. 8, e25283.
- Rahman, A., Takahashi, M., Shibasaki, K., Wu, S., Inaba, T., Baskin, T.I.** (2010) Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* roots require the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells. *Plant Cell*. 22, 1762–1776.
- Rakusová, H., Abbas, M., Han, H., Song, S., Robert, H.S., Friml, J.** (2016). Termination of shoot gravitropic responses by auxin feedback on PIN3 polarity. *Current Opinion in Plant Biology*. 26, 3026–3032.
- Raven, J.** (1975) Transport of indol acetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist*. 74, 163–172.
- Robert, H.S. y Friml, J.** (2009) Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology*. 5, 5.
- Romao, R., Escudero, A.** (2005) Gypsum physical soil surface crusts and the existence of gypsophytes in semi-arid central Spain. *Plant Ecology*. 181,1–11.
- Rosquete, M.R., von Wangenheim, D., Marhavý, P., Barbez, E., Stelzer, E.H.K., Benková, E., Maizel, A., Kleine-Vehn, J.** (2013) An auxin transport mechanism restricts positive orthogravitropism in lateral roots. *Current Opinion in Plant Biology*. 23, 817-822.
- Rubery, P.H. y Sheldrake, A.R.** (1973) Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. *Nature: New Biology*. 244, 285–288.
- Rubery, P.H. y Sheldrake, A.R.** (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta*. 118, 101–121.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J., Estelle, M.** (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes and Development*. 12, 198–207.
- Ruzzi, M. y Aroca, R.** (2015) Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*: 196, 124–134.
- Salehin, M., Bagchi, R., Estelle, M.** (2015) SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *The Plant Cell*. 27, 9–19.
- Sánchez-Parra, B., Frerigmann, H., Alonso, M.M.P., Loba, V.C., Jost, R., Hentrich, M., Pollmann, S.** (2014) Characterization of four bifunctional plant IAM/PAM-amidohydrolases capable of contributing to auxin biosynthesis. *Plants*. 3, 324–347.
- Santner, A. y Estelle, M.** (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*. 459, 1071–1078.

- Sauer, M. y Kleine-Vehn, J.** (2019) PIN-FORMED and PIN-LIKES auxin transport facilitators. *Development*. 146, dev168088.
- Shelef, O., Lazarovitch, N., Rewald, B., Golan-Goldhirsh, A., Rachmilevitch, S.** (2010) Root halotropism: salinity effects on *Bassia Indica* root. *Plant Biosystems*. 144(2), 471–478.
- Shi, C.L., Park, H.B., Lee., J.S., Ryu, S., Ryu, C.M.** (2010) Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana* by the rhizobacterium *Serratia marcescens* is through both auxin dependent and -independent signaling pathways. *Molecules and Cells*. 29, 251-258.
- Singh, G., Retzer, K., Vosolsobě, S., Napier, R.** (2018) Advances in understanding the mechanism of action of the auxin permease AUX1. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 3391.
- Singh, M., Gupta, A., Laxmi, A.** (2017) Striking the Right Chord: Signaling Enigma during Root Gravitropism. *Frontiers in Plant Science*. 8: 1304.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R.** (2007a) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*. 31, 425-448.
- Spaepen, S., Bossuyt, S., Engelen, K., Marchal, K., Vanderleyden, J.** (2014) Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. *New Phytologist*. 201, 850-861.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D., Dolezal, k., Schlereth, A., Jurgens, G., Alonso J.M.** (2008) TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*. 133, 177–191.
- Su, S.H., Gibbs, N.M., Jancewicz, A.L., Masson, P.H.** (2017) Molecular mechanisms of root gravitropism. *Current Biology*. 27, R964–R972.
- Sukumar, P., Legue, V., Vayssieres, A., Martin, F., Tuskan, G.A., Karulli, U.C.** (2013) Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant–microorganism interactions. *Plant Cell and Environment*. 36, 909-919.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba, T., Zhao, Y., Kamiya, Y., Kasahara, H.** (2009) Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *PNAS*. 106, 5430–5435.
- Sun F, Zhang W, Hu H, Li B, Wang Y, Zhao Y, Li, K., Liu, M., Li, X.** (2008) Salt modulates gravity signaling pathway to regulate growth direction of primary roots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 146(1), 178–188.
- Swarup, R., Friml, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., Bennett, M.** (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two function ally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Development*. 15, 2648–2653.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M.P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J.D., Taylor, C.G., Schachtman, D.P., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beekman, T., Laplaze, L., Bennett, M.J.** (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*. 10, 946–954.
- Swarup, R. y Péret, B.** (2012) AUX/LAX family of auxin in flux carriers—an overview. *Frontiers in Plant Science*. 3, 225.

- Taniguchi M, Furutani M, Nishimura T, Nakamura M, Fushita T., Iijima, K., Baba, K., Tanaka, H., Toyota, M., Tasaka, M., Morita, M.T.** (2017) The Arabidopsis LAZY1 family plays a key role in gravity signaling within statocytes and in branch angle control of roots and shoots. *Plant Cell*. 29, 1984–99.
- Teixeira, J.A.S. y Tusscher, K.H.T.** (2019) The Systems Biology of Lateral Root Formation: Connecting the dots. *Molecular Plant*. 12, 784–803.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., Guilfoyle, T.J.** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*. 9, 1963-1971.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., Scheres, B.** (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*. 390, 287–89.
- van den Berg, T., Korver, R.A., Testerink, C., ten Tusscher, K.H.W.J.** (2016) Modeling halotropism: a key role for root tip architecture and reflux loop remodeling in redistributing auxin. *Development*. 143(8), 3350–3362.
- Vandenbrink, J.P. y Kiss, J.Z.** (2016) Space, the final frontier: a critical review of recent experiments performed in microgravity. *Plant Science*. 243, 115–119.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Boyce, AN.** (2016) Role of plant growth promoting Rhizobacteria in agricultural sustainability- a review. *Molecules*. 573 (21), 1–17.
- Vermeer, J.E., von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, E.H.K.K., Maizel, A., Geldner, N.** (2014) A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in *Arabidopsis*. *Science*. 343, 178–183.
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P.A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E.J., Yazaki, K., Theodoulou, F.L.** (2008) Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*. 13, 151–159.
- Viaene T, Landberg, K., Thelander, M., Medvecka, E., Pederson, E., Feraru, E., Cooper, E.D., Karimi, M., Charles, F., Delwiche, C.F., Ljung, K., Geisler, M., Sundberg, E., Friml J.** (2014) Directional auxin transport mechanisms in early diverging land plants. *Current Biology*. 24, 2786–2791.
- Voß, U., Bishopp, A., Farcot, E., Bennett M.J.** (2014) Bennett Modelling hormonal response and development. *Trends in Plant Science*. 19, 311-319.
- Von Sachs, J.** (1887) “The anisotropy of the organs of plants,” in Lectures on the Physiology of Plants. Ed. H. M. Ward (Oxford: The Clarendon Press). 698–717.
- Wan Y, Jasik J, Wang L, Hao H, Volkmann D, Menzel D, Dieter., Mancuso, S., Baluska, F., Lin J.** (2012) The signal transducer NPH3 integrates the phototropin1 photosensor with PIN2- based polar Auxin transport in *Arabidopsis* root phototropism. *Plant Cell*. 24(2), 551–565.
- Wang, C., Yan, X., Chen, Q., Jiang, N., Fu, W., Ma, B., Liu, J., Li, C., Bednarek, S.Y., Pan, J.** (2013) Clathrin light chains regulate clathrin- mediated trafficking, auxin signaling, and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 25, 499-516.
- Weller, B., Zourelidou, M., Frank, L., Barbosa, I.C., Fastner, A., Richards, S., Jugens, G., Hammes, U,Z., Schwechheimer, C,** (2017) Dynamic PIN-FORMED auxin efflux carrier phosphorylation at the plasma membrane controls auxin efflux-dependent growth. *PNAS*. 114: E887-E896.

Woodward, A.W. y Bartel, B.I (2005). Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany*. 95, 707–735.

Xuan, W., Audenaert, D., Parizot, B., M€oller, B.K., Njo, M.F., De Rybel, B., De Rop, G., Van Isterdael, G., M€ah€onen, A.P., Vanneste, S., Beeckman, T. (2015). Root cap-derived auxin pre-patterns the longitudinal axis of the *Arabidopsis* root. *Current Biology*. 25, 1381–1388.

Xuan, W., Band, L.R., Kumpf, R.P., Van Damme, D., Parizot, B., De Rop, G., Opendacker, D., M€oller, B.K., Skorzinski, N., Njo, M.F., De Rybel, B., Audenaert, D., Nowack, M.K., Vanneste, S., Beeckman T. (2016) Cyclic programmed cell death stimulates hormone signaling and root development in *Arabidopsis*. *Science*. 351, 384–387.

Zamioudis, C., Mastranesti, P., Dhonukshe, P., Blilou, I., Pieterse, C.M. (2013) Unraveling root developmental programs initiated by beneficial *Pseudomonas* spp. bacteria. *Plant Physiology*. 162, 304-318.

Zazımalova, E., Murphy, A.S., Yang, H., Hoyerova, K., Hosek, P. (2010) Auxin transporters-why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2, a001552.

Zhang, H., Kim, M.S., Krishna-machair, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M.A., Ryu, C.M., Allen, R., Melo, I.S., Pare, P.W. (2007) Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in *Arabidopsis*. *Planta*. 226, 839-851.

Zhou, J.J. y Luo, J. (2018) The PIN-FORMED auxin efflux carriers in plants. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 2759.

Zhao, Y. (2012) Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant*. 5, 334–338.

Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J., Celenza, J.L. (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & Development*. 16, 3100–3112.

Zourelidou, M., Absmanner, B., Weller, B., Barbosa, I.C.R., Willige, B.J., Fastner, A., Verena Streit V., Sarah A Port, S.A., Colcombet, J., Bentem S.V., Hirt, H., Kuster, B., Schulze, W.X., Hammes, U.Z., Schwechheimer, C. (2014) Auxin efflux by PIN-FORMED proteins is activated by two different protein kinases, D6 PROTEIN KINASE and PINOID. *ELife*. 3, e02860.